



TITLE:

シグナル分子に応答するRNA-ペプチド複合体の創製(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

長谷川, 哲也

CITATION:

長谷川, 哲也. シグナル分子に応答するRNA-ペプチド複合体の創製. 京都大学, 2007, 博士(エネルギー科学)

ISSUE DATE:

2007-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k13175>

RIGHT:

シグナル分子に応答する RNA-ペプチド複合体の創製

長谷川 哲也

シグナル分子に応答する RNA-ペプチド複合体の創製

長谷川 哲也

目次

第一章 序論

1-1 研究背景	1
1-2 シグナル分子に応答する RNA-ペプチド複合体の構築意義	3
1-2-1 生体高分子を基にした蛍光性バイオセンサーの現状と問題点	3
1-2-2 RNA-ペプチド複合体を基にした蛍光性バイオセンサーの構築意義	5
引用文献	9

第二章 リン酸化チロシンを特異的に認識する RNA-ペプチド複合体の創製

概要	12
2-1 緒言	12
2-2 結果と考察	16
2-2-1 リン酸化チロシンに対して親和性を有するリボヌクレオペプチドの選択	16
2-2-2 リン酸化チロシン結合性リボヌクレオペプチドの特性	19
2-2-3 リン酸化チロシン結合性リボヌクレオペプチドリセプターの親和性評価	20
2-2-4 リン酸化チロシン結合性リボヌクレオペプチドリセプターの選択性	21
2-3 結論	23
2-4 実験の部	24
2-4-1 試薬	24
2-4-2 ランダムな 30 塩基を有する DNA ライブラリーの作製	25
2-4-3 ランダムな 30 塩基を有する RNA ライブラリーの作製	25
2-4-4 Rev ペプチドの合成	26
2-4-5 リン酸化チロシンに対して親和性を有するリボヌクレオペプチドの選択	26
2-4-6 選択されたリボヌクレオペプチドの RNA 配列解析	27
2-4-7 クローニングを行ったプラスミド DNA の配列解析	27
2-4-8 配列解析を行ったプラスミド DNA から RNA の調製	28
2-4-9 RNA の 5'末端標識	28
2-4-10 リボヌクレオペプチドリセプターとリン酸化チロシンアガロース樹脂の結合試験	28

2-4-11 リボヌクレオペプチドリセプターとリン酸化チロシンの平衡解離定数の測定	29
2-4-12 リボヌクレオペプチドリセプターの競合試験	29
引用文献	30

第三章 細胞内シグナル伝達経路に関わるタンパク質のチロシン

リン酸化部位を検出する RNA-ペプチド複合体の創製

概要	32
3-1 緒言	32
3-2 結果と考察	36
3-2-1 ランダム領域の塩基長が異なるリボヌクレオペプチドライブラリーの構築	36
3-2-2 GpYSR アガロース樹脂の作製	39
3-2-3 ネガティブ選択法を用いた GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドの選択	39
3-2-4 GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドの特性	42
3-2-5 GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドリセプターの親和性評価	43
3-2-6 GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドリセプターの選択性	44
3-2-7 GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドセンサーの選別	48
3-2-8 GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドセンサーの機能評価	52
3-2-9 基質濃度を段階的に下げた選択法による GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドの選択	55
3-2-10 GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドの特性	57
3-2-11 GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドリセプターの親和性評価	57
3-2-12 GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドリセプターの選択性	59
3-2-13 GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドセンサーの選別	63
3-2-14 GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドセンサーの機能評価	65
3-3 結論	68
3-4 実験の部	69
3-4-1 試薬	69
3-4-2 ランダム領域の塩基長が異なる DNA ライブラリーの作製	69
3-4-3 ランダム領域の塩基長が異なる RNA ライブラリーの作製	70
3-4-4 リン酸化チロシンを含むテトラペプチドの合成	70
3-4-5 GpYSR アガロース樹脂の作製	73

3-4-6 GpYSR アガロース樹脂の固定化量の算出	73
3-4-7 ネガティブ選択法を用いた GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドの選択	74
3-4-8 基質濃度を段階的に下げた選択法による GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドの選択	75
3-4-9 選択されたリボヌクレオペプチドの RNA 配列解析	76
3-4-10 クローニングを行ったプラスミド DNA の配列解析	76
3-4-11 配列解析を行ったプラスミド DNA から RNA の調製	76
3-4-12 RNA の 5'末端標識	76
3-4-13 リボヌクレオペプチドリセプターと GpYSR アガロース樹脂との結合試験	76
3-4-14 リボヌクレオペプチドリセプターと GpYSR の平衡解離定数の測定	77
3-4-15 リボヌクレオペプチドリセプターの競合試験	77
3-4-16 リボヌクレオペプチドセンサーの 96 穴プレートを用いた蛍光測定	78
3-4-17 リボヌクレオペプチドセンサーの蛍光測定	79
引用文献	79

第四章 蛍光性 RNA-ペプチド複合体の機能拡張法の開発

概要	82
4-1 緒言	82
4-2 結果と考察	84
4-2-1 蛍光修飾 Rev ペプチド誘導体の設計	84
4-2-2 蛍光性 ATP センサーの最適化	85
4-2-3 蛍光性 GpYSR センサーの最適化	88
4-3 結論	90
4-4 実験の部	91
4-4-1 試薬	91
4-4-2 蛍光修飾 Rev ペプチド誘導体の合成	91
4-4-3 リボヌクレオペプチドセンサーの 96 穴プレートを用いた蛍光測定	91
引用文献	92

第五章 生理活性分子ドーパミンに応答する蛍光性 RNA-ペプチド複合体の創製	
概要	93
5-1 緒言	93
5-2 結果と考察	97
5-2-1 ドーパミンに対して親和性を有するリボヌクレオペプチドの選択	97
5-2-2 ドーパミン結合性リボヌクレオペプチドセンサーの選別	102
5-2-3 ドーパミン結合性リボヌクレオペプチドセンサーの機能評価	104
5-3 結論	107
5-4 実験の部	108
5-4-1 試薬	108
5-4-2 ランダム領域の塩基長が異なる DNA ライブラリーの作製	108
5-4-3 ランダム領域の塩基長が異なる RNA ライブラリーの作製	109
5-4-4 ドーパミンに対して親和性を有するリボヌクレオペプチドの選択	109
5-4-5 選択されたリボヌクレオペプチドの RNA 配列解析	110
5-4-6 クローニングを行ったプラスミド DNA の配列解析	110
5-4-7 配列解析を行ったプラスミド DNA から RNA の調製	110
5-4-8 リボヌクレオペプチドセンサーの 96 穴プレートを用いた蛍光測定	110
引用文献	111
第六章 総括	112
論文目録	114
学会発表	116
謝辞	118

第一章

序論

1-1 研究背景

現代社会を支える重要な資源である石油、石炭、天然ガスの化石資源は、便利で豊かな生活を享受する為のエネルギー源として必要不可欠な物質である。しかし、今日の化石資源に依存したエネルギー大量消費社会は、大気汚染、水質汚染、異常気象といった生体に甚大な影響を及ぼす環境問題を引き起こす要因になった。とりわけ環境汚染から派生した環境ホルモンと呼ばれる外因性内分泌攪乱化学物質は、生体の内分泌機能に影響を及ぼす化学物質として近年注目されている[1]。

環境ホルモンは、地球環境中に一旦放出されるとほとんど分解を受けずに生物の体内に取り込まれ、生体内において生分解を受けないことが知られている。生体内に取り込まれた環境ホルモンは、生体の恒常性を保つ為に必要なホルモンの働きを妨げたり、ホルモンと同じような働きをすることによって、生殖機能の阻害あるいは悪性腫瘍を引き起こすなど生体に障害や有害な影響を与えている。例えば、日々の生活の中で使用されている防腐剤・食品添加物・殺菌剤・殺虫剤・農薬、または日常生活から廃棄されるゴミの焼却などによって生成するダイオキシンなどの約70種の化学物質が、生体にとって悪影響を与える可能性が高い環境ホルモンとして疑われている[2]。

生体にとって有害な化学物質を評価することは、環境ホルモンをはじめとする環境汚染物質が環境問題とどのように関連性があるのかを明らかにするだけでなく、地球環境へ配慮した環境保全施策を推進するために必要である。特に生態系への暴露量の多い化学物質もしくはその可能性が高い化学物質については、生体に与える影響等を詳細に検証しなければならない。そのためには多種類の環境ホルモンを迅速かつ高感度に検出する技術が望まれる。核酸、タンパク質、多糖類などの生体高分子は、元々が生体由来の物質であることから、地球環境にとって優しい物質であり、生体高分子を用いて環境ホルモンを迅速かつ高感度に検出する技術の開発は、環境的な側面と安全面から考えて極めて有用であり重要である。

また、現在の化石資源に依存したエネルギー問題と環境問題を考慮すると、地球環境に負荷がかか

らない化石資源エネルギーの代替となるクリーンなエネルギー生産・利用システムの開発も推進していく必要がある。生体を構成している細胞内では、情報伝達システム、物質変換システム、物質輸送システム、遺伝子発現システムなどの細胞内エネルギー利用システムが統合されて機能しており、非常にグリーンかつ高効率なエネルギーの生産と利用が行われている。この細胞内エネルギー利用システムの原理に基づいた理想的なエネルギー利用システムを現代の社会生活に構築できれば、化石資源に依存したエネルギー体系からの脱却を促進し、地球環境に優しいクリーンで高効率なエネルギーシステム体系に移行することが可能になると考えられる。

細胞内エネルギー利用システムの原理を応用したエネルギー利用システムを現代社会で構築するためには、細胞内エネルギー利用システムに関与する個々の細胞内シグナル伝達経路を解明する必要がある。多数のシグナル分子が媒介し、複雑なネットワークを形成する細胞内シグナル伝達経路は、細胞の増殖・分化、ガン化、細胞死などの細胞応答の制御に関与することが知られている[3, 4]。細胞応答の制御に関わる任意のシグナル分子を迅速かつ高感度に検出できる一般的な技術は、未だ確立されておらず、標的とするシグナル分子に対して迅速化、高感度化、高精度化された検出技術が望まれる。シグナル分子の応答様式を迅速かつ高感度に検出できる可能性が高い技術の一つとして、生体高分子を基盤としたバイオセンサーが挙げられる[5]。基質を高選択的に識別できる生体高分子リセプターの特性を活かしたバイオセンサーは、細胞内の多種類のシグナル分子に対して適用できるだけでなく、環境汚染物質や環境ホルモンなどに対しても適用が可能な技術である。標的とするシグナル分子を迅速かつ高感度に検出できるバイオセンサーの技術が開発できれば、シグナル伝達経路が明らかになるだけでなく、細胞内エネルギー利用システムの原理を応用したエネルギー利用システムが社会で展開できるようになると考えられる。また、環境汚染物質や環境ホルモンの定量分析にバイオセンサーの技術が応用されれば、環境汚染の規模が評価できるようになることも考えられる。このように、生体高分子を基盤とした迅速化、高感度化、高精度化されたバイオセンサーを活用した技術が確立されれば、環境負荷の少ない持続的発展が可能な社会に向けた環境保全・省エネルギー型の技術に対して大きく貢献すると期待される。

1-2 シグナル分子に応答する RNA-ペプチド複合体の構築意義

1-2-1 生体高分子を基にした蛍光性バイオセンサーの現状と問題点

生体高分子を利用したバイオセンサーの基本構成は、優れた分子識別機能を有する生体高分子リセプターが基質分子との結合に伴って、信号変換部から出力される電気的、熱的、光学的変化といった信号に変換されることにある[5]。近年、細胞内シグナル伝達経路におけるシグナル分子の動態を解析する蛍光性バイオセンサーの開発が、盛んに行われている[6, 7]。

X線結晶構造解析法やNMRによる構造解析法を利用した構造生物学の著しい進展により、生体高分子の三次元構造情報が多数得られるようになってきた[8]。生体高分子をもとにしたバイオセンサーの作製は、三次元構造情報に基づいた分子設計により、蛍光分子などの各種レポーター分子を生体高分子リセプター中に化学修飾することによって作製されている[9, 10]。例えば、森井ら[11]が開発した受容体タンパク質を基にしたイノシトール三リン酸(IP₃)に対する蛍光性バイオセンサーがある。蛍光性IP₃センサーは、受容体タンパク質PLC δ_1 PHドメインの三次元構造情報を基にして、IP₃結合領域近傍のアミノ酸残基をシステインに変換し、ダンシルやフルオレセインといった各種蛍光分子をチオール特異的な化学反応によってタンパク質中に化学修飾することによって作製される。しかし、この手法により作製された蛍光性バイオセンサーは、標的結合部位における変異や蛍光分子の化学修飾によって基質選択性や親和性が低下する問題点がある。また、2005年時点で報告されているタンパク質立体構造データベース(Protein Data Bank, PDB)には、3万6千を超える三次元構造情報が存在するが、望みとする基質分子に対してバイオセンサーを構築する際に、基質分子に対する受容体の三次元構造情報がPDBの中に存在しない場合があり、適用範囲に制限がある[12]。

1990年代になって、*in vitro* セレクション法から展開された核酸分子リセプターを基にした蛍光性バイオセンサーも多数報告されるようになってきた[13-20]。1990年にSzostakら[21]、Goldら[22]によって開発された*in vitro* セレクション法(図1-1)は、核酸分子ライブラリーの中から、標的分子に結合する分子種の選択と選択された分子種の増幅という一連の操作を繰り返すことによって、標的分子に対して高い親和性を有する核酸分子リセプターの構築方法論である[23-26]。比較的分子量が小さい有機低分子(核酸、抗生物質、アミノ酸、糖類など)から分子量の大きいタンパク質(T4 DNA ポリメラーゼ、翻

訳伸長因子 EF-TU など)あるいは無機物質[27](パラジウムなど)などに対して核酸分子リセプターが作製されていることから、*in vitro* セレクション法は、基質分子の適用範囲が広く、テーラメイドなリセプターの作製法として、汎用性が高い有用な方法論である。

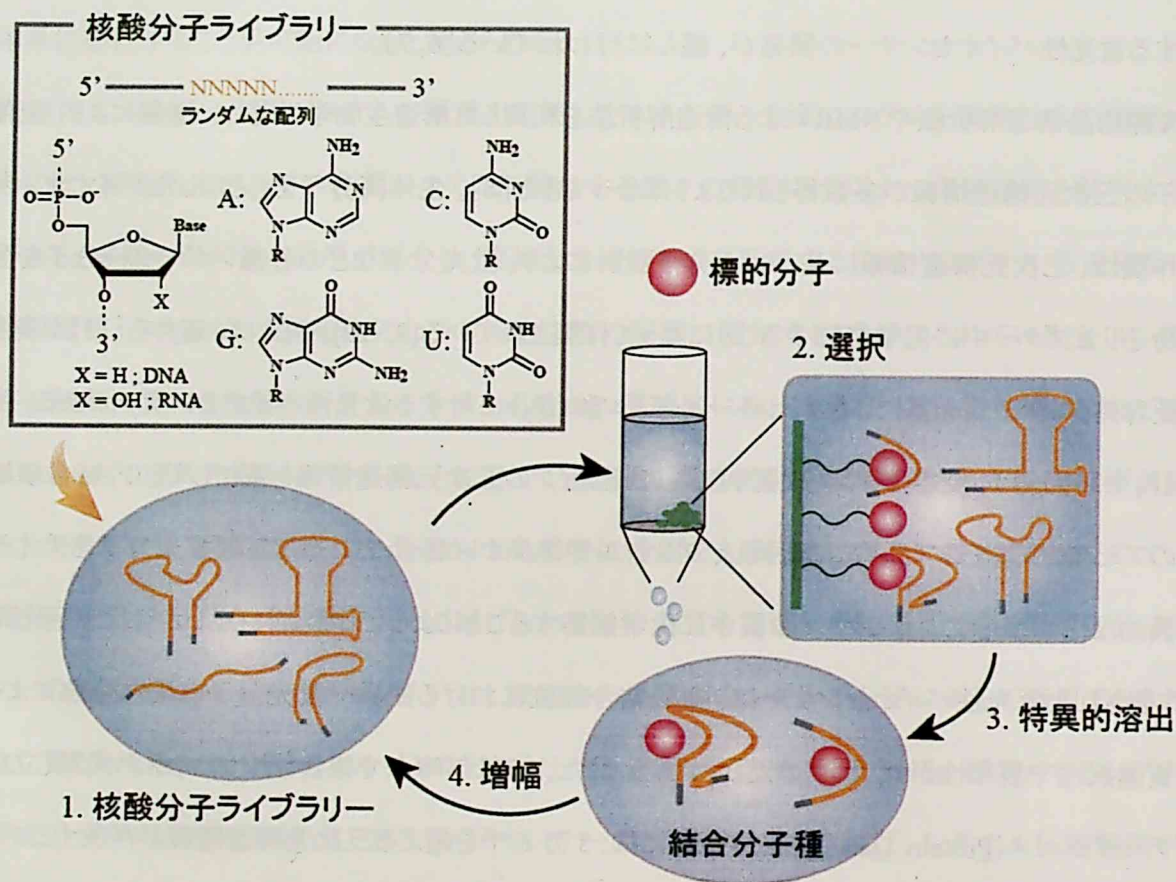


図1-1 *in vitro* セレクション法の概念図

1. 4種類の核酸塩基がランダムに並んだ配列をもつDNAあるいはRNAは、多様な高次構造を形成している。
2. 核酸分子ライブラリーの中から標的分子に結合する分子種を選択する。
3. 結合分子種を競合的な溶出により回収する。
4. 選択操作で結合した分子種をPCRによる増幅(RNAの場合、RNAからDNAへの逆転写反応が必要である)を行って、再び選択操作を行う為に必要な量を得る。

in vitro セレクション法により作製された核酸分子リセプターを基にした蛍光性バイオセンサーは、基質選択性と親和性に優れた核酸分子リセプターの糖、塩基、もしくはリン酸部位に蛍光分子を化学修飾することによって作製される[28-34]。リセプター分子に対して蛍光分子の化学修飾を必要とする核酸分子センサーの作製法は、多くの場合、リセプターが保持していた親和性や選択性を損なう可能性があり、タンパク質センサーの作製法と共通する問題点を抱えている。

タンパク質リセプターや核酸分子リセプターを基にした蛍光性バイオセンサーの作製法において、1. 任意の基質に対して作製が可能である、2. 様々な波長領域での測定が可能である、3. 広い濃度領域での測定が可能である、4. 優れた感度を有するといった条件を満足する一般的な蛍光性バイオセンサー構築方法論は、現在までに確立されていない。

1-2-2 RNA-ペプチド複合体を基にした蛍光性バイオセンサーの構築意義

RNA とタンパク質から構成される巨大な複合体であるリボソーム(図1-2)は、生命維持の為に必須なタンパク質生合成という役割を担っており、近年の三次元構造解析からリボソームの精密な分子認識機構によって制御されている機能と構造との相関が明らかになりつつある[35, 36]。精密な分子認識能を有する RNA-タンパク質複合体は、標的分子にあつらえたリセプターをはじめとする機能性生体高分子を創製するための有用な基本骨格になると考えられる。

2002 年森井ら[37]は、三次元構造解析されたヒト免疫不全ウイルス(HIV)由来の Rev ペプチドと RRE (Rev Response Element: Rev ペプチド結合領域) 由来の RNA から形成される RNA-ペプチド複合体(リボヌクレオペプチド)を構造的な土台として、*in vitro* セレクション法によって、アデノシン三リン酸(ATP)に対して特異的に結合するリボヌクレオペプチドリセプターを開発した(図1-3 (A))。ATP に対して高い基質選択性と親和性を有するリセプターが作製できたことから、リボヌクレオペプチドを基にした多種類の分子に対して適用可能な生体高分子リセプターの構築方法論が確立された。

さらに2006年萩原ら[38]は、ATP 結合性リボヌクレオペプチドリセプターを基にして、RNA サブユニットのATP 結合領域に対して蛍光分子を化学修飾するのではなく、ペプチドサブユニットに蛍光分子を化学修飾することによって、リセプターの活性を保持させた蛍光性 ATP センサーを開発した(図1-3

(B)。リボヌクレオペプチドを基にした蛍光性バイオセンサーは、ATP に対して様々な親和性を有する RNA サブユニットと、様々な励起・発光波長を有する蛍光分子が導入されたペプチドサブユニットを組み合わせて選別することによって作製できる(図1-4)。この方法により、蛍光分子を基質結合領域へ直接導入することなく、任意の波長で幅広い濃度域で応答する ATP センサーが簡便に作製できたことから、従来の蛍光センサー構築法の問題点が解決されたと考えられる。

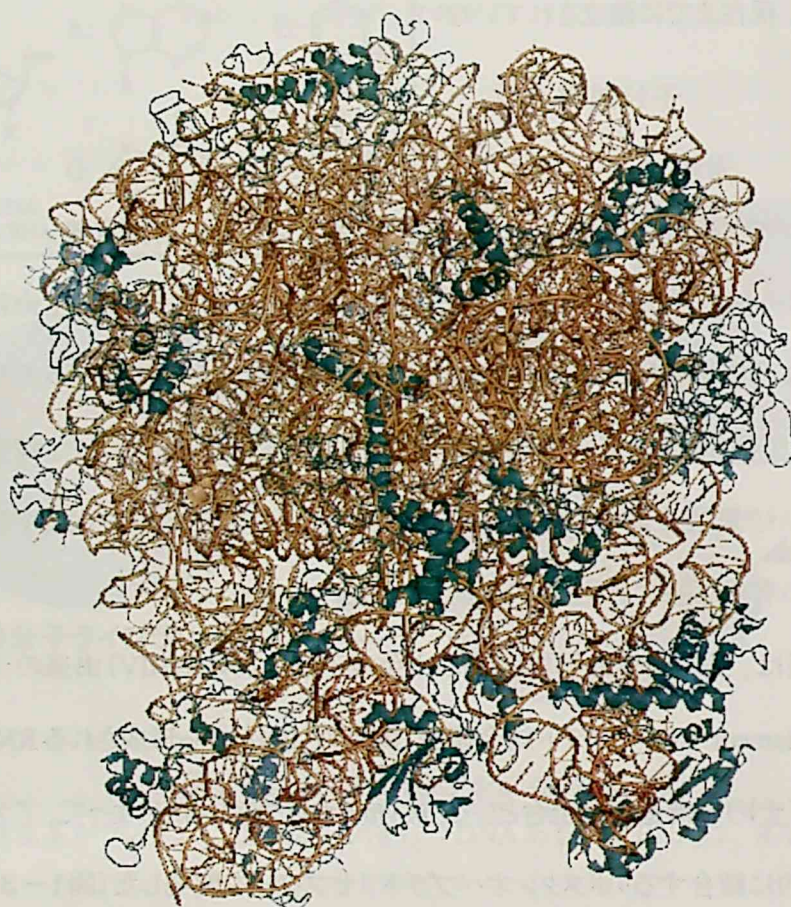
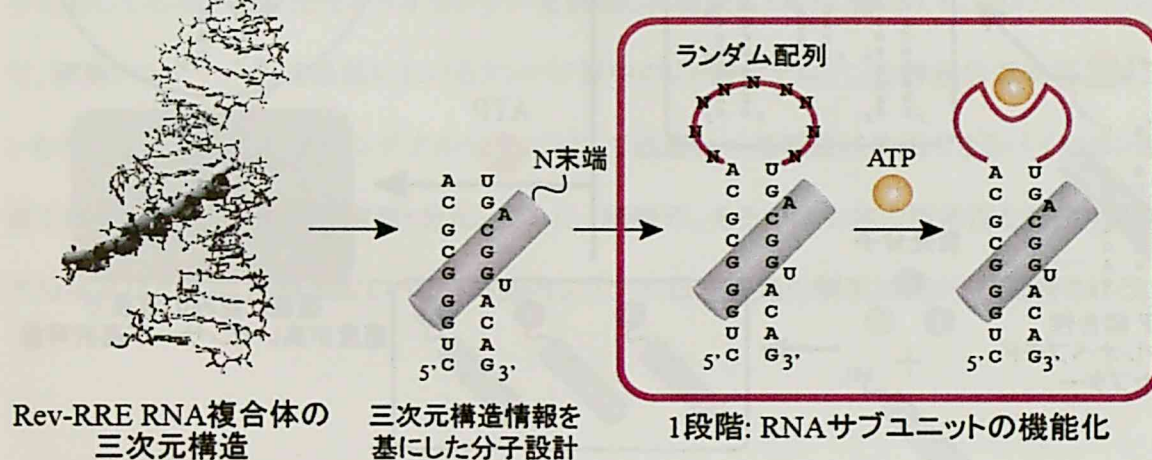


図1-2 X線結晶構造解析から得られた50Sリボソームの構造
(茶色のリボン図はRNAを示し、水色のリボン図はタンパク質を示す。)

(A)



(B)

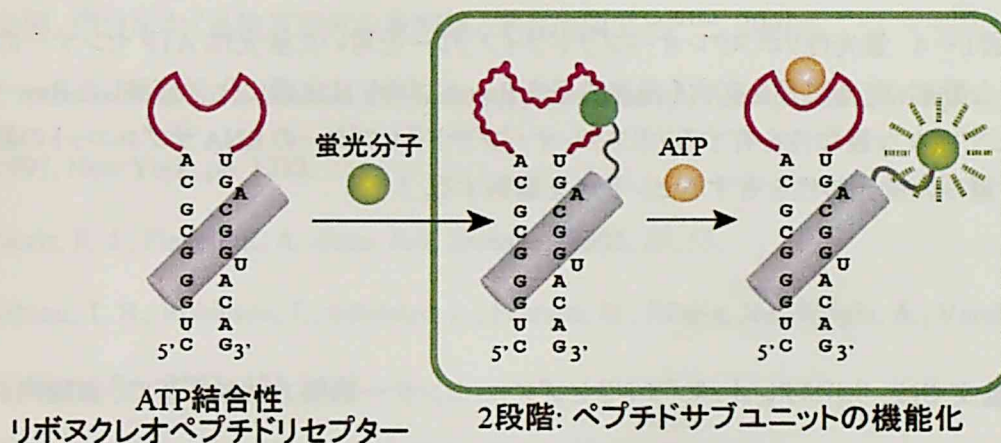


図1-3 リボヌクレオペプチドを基にした蛍光性 ATP センサーの設計概念図

(A) 1 段階: Rev-RRE RNA 複合体の三次元構造を基に Rev と RRE RNA の結合に影響しない領域にランダムな核酸塩基を導入し、*in vitro* セレクション法により ATP との結合場を作製する。

(B) 2 段階: RNA 領域における ATP との結合場を保存したまま、Rev ペプチドの N 末端に蛍光分子を導入することによりセンサーへ機能改変する。

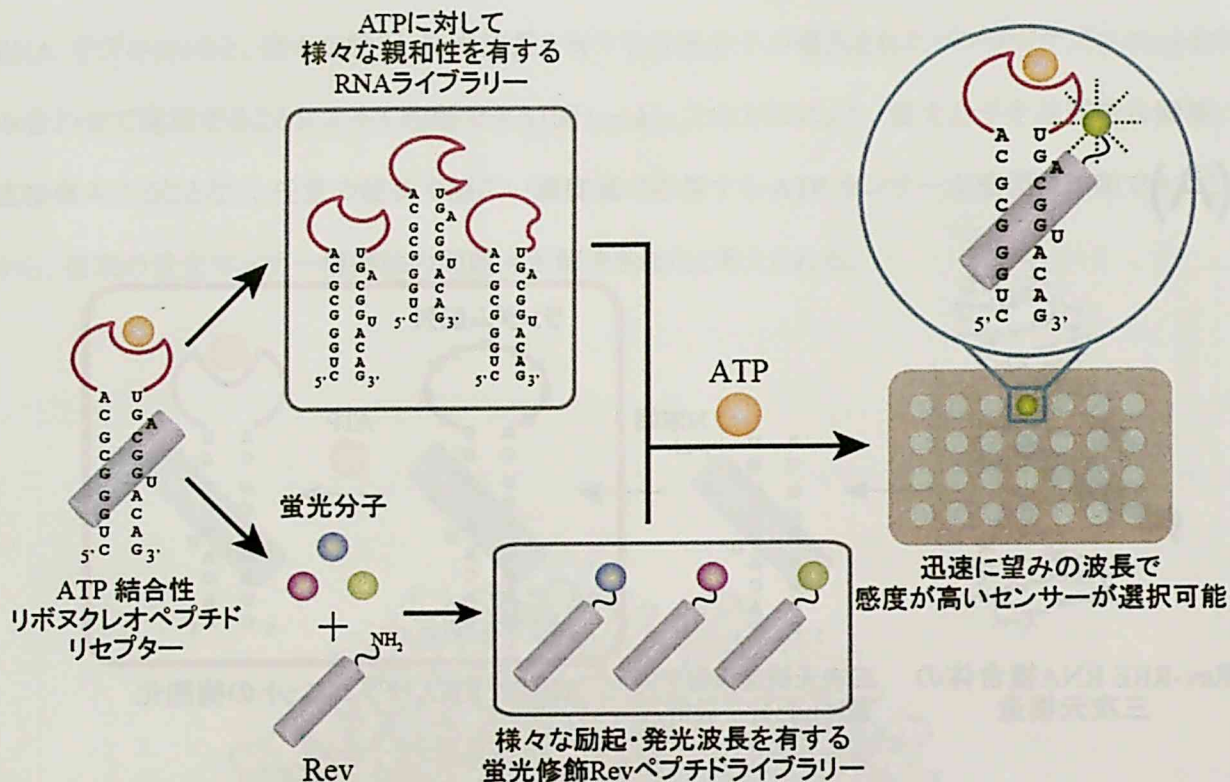


図1-4 蛍光性リボヌクレオペプチドライブラリーを用いた蛍光性 ATP センサーの設計戦略 (様々な励起・発光波長を有する蛍光分子をRev ペプチドN末端に化学修飾したRev ペプチドと、ATP に対して様々な親和性を有するリボヌクレオペプチドリセプターの RNA サブユニットの組み合わせの中から、望みの蛍光特性を有するセンサーを選別する。)

本論文では、リボヌクレオペプチドリセプター・センサー構築方法論を基に、細胞内シグナル伝達経路に関わるシグナル分子に対して高選択的に捕捉するリボヌクレオペプチドリセプターの開発及び光学的にシグナル分子を迅速かつ高感度に検出するリボヌクレオペプチドセンサーの開発を行った。シグナル伝達経路を解析する為には、シグナル伝達経路に関わるシグナル分子を網羅的・統括的に検出するシステムの構築が必須であるが、現在のところそのような技術は存在しない。なぜなら、生体内シグナル分子の基本構成因子がアミノ酸、核酸、糖や脂質など複雑多岐にわたる分子構造を有しており、標的シグナル分子に対して幅広い濃度域で応答するリセプターを迅速に構築することが現在の技術では困難であることが理由に挙げられる。またリセプターからセンサーへの機能改変には、1-2-1で記述した問題点がある。森井・萩原らが開発したリボヌクレオペプチドリセプター・センサー構築方法論は、

標的シグナル分子の分子構造に依存せず、任意の基質分子に対して、幅広い濃度域で応答するテーラーメイドなセンサーが迅速に作製できることから、多種類のシグナル分子を検出するための基本概念としては理想的である。

本論文では、リボヌクレオペプチドリセプター・センサー構築方法論を基盤として、生体内シグナル分子に対して応答する蛍光性バイオセンサーを構築した結果について報告する。標的シグナル分子として、細胞内シグナル伝達経路におけるタンパク質中のリン酸化チロシンや神経伝達物質であるドーパミンを選択した。これらの標的シグナル分子に対して迅速かつ高感度に検出できるバイオセンサーの技術が開発できれば、細胞の増殖・分化、ガン化、細胞死、あるいは生体の恒常性を維持する神経系や内分泌系などのよく理解されていない細胞内シグナル伝達経路の解明に繋がると期待される。

引用文献

- [1] 日本化学会編、内分泌かく乱物質研究の最前線、学会出版センター、2001.
- [2] Keith, L. H. In *Environmental Endocrine Disruptors A Handbook of Property Data.*; Wiley-Interscience: 1997, New York, pp. 1232.
- [3] Dong, C.; Davis, R. J.; Flavell, R. A. *Annu. Rev. Immunol.* **2002**, *20*, 55.
- [4] Chen, Z.; Gibson, T. B.; Robinson, F.; Silvestro, L.; Pearson, G.; Bing-e, Xu; Wright, A.; Vanderbilt, C.; Cobb, M. H. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2449.
- [5] 日本化学会編、バイオセンシングとそのシステム、学会出版センター、1998.
- [6] Zhang, J.; Campbell, R. E.; Ting, A. Y.; Tsien, R. Y. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 906.
- [7] Chen, I.; Ting, A. Y. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005** *16*, 35.
- [8] Aravind, L.; Iyer, L. M.; Koonin, E. V. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 409.
- [9] de Lorimier, R. M.; Smith, J. J.; Dwyer, M. A.; Looger, L. L.; Sali, K. M.; Paavola, C. D.; Rizk, S. S.; Sadigov, S.; Conrad, D. W.; Loew, L.; Hellinga, H. W. *Protein Sci.* **2002**, *11*, 2655.
- [10] Hellinga, H. W.; Marvin, V. S. *Trends Biotech.* **1998**, *16*, 183.
- [11] Morii, T.; Sugimoto, K.; Makino, K.; Otsuka, M.; Imoto, K.; Mori, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*,

1138.

- [12] Fukuzawa, K.; Kitaura, K.; Uebayasi, M.; Nakata, K.; Kaminuma, T.; Nakano, T. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1.
- [13] Jhaveri, S. D.; Kirby, R.; Conrad, R.; Maglott, E. J.; Bowser, M.; Kennedy, R. T.; Glick, G.; Ellington, A. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2469.
- [14] Jayasena, S. D. *Clin. Chem.* **1999**, *45*, 1628.
- [15] Jhaveri, S.; Rajendran, M.; Ellington, A. D. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 1293.
- [16] Llano-Sotelo, B.; Chow, C. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 213.
- [17] Yamana, K.; Ohtani, Y.; Nakano, H.; Saito, I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3429.
- [18] Nutiu, R.; Li, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4771.
- [19] Ho, H. A.; Leclerc, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1384.
- [20] Merino, E. J.; Weeks, K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *127*, 12766.
- [21] Ellington, A. D.; Szostak, J. W. *Nature* **1990**, *346*, 818.
- [22] Tuerk, C.; Gold, L. *Science* **1990**, *249*, 505.
- [23] Osborne, S. E.; Ellington A. D. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 349.
- [24] Joyce, G. F. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 791.
- [25] Wilson, D. S.; Szostak, J. W. *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 611.
- [26] Breaker, R. R. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 371.
- [27] Gugliotti, L. A.; Feldheim, D. L.; Eaton, B. E. *Science* **2004**, *304*, 850.
- [28] Llano-Sotelo, B.; Chow, C. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 213.
- [29] Stojanovic, M. N.; de Prada, P.; Landry, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11547.
- [30] Jhaveri, S. D.; Kirby, R.; Conrad, R.; Maglott, E. J.; Bowser, M.; Kennedy, R. T.; Glick, G.; Ellington, A. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2469.
- [31] Yamana, K.; Ohtani, Y.; Nakano, H.; Saito, I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3429.
- [32] Nutiu, R.; Li, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4771.
- [33] Ho, H. A.; Leclerc, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1384.

- [34] Merino, E. J.; Weeks, K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12766.
- [35] Noller, H. F. *Science* **2005**, *309*, 1508.
- [36] Moore, P. B.; Steitz, T. A. *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 813.
- [37] Morii, T.; Hagihara, M.; Sato, S.; Makino, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4617.
- [38] Hagihara, M.; Fukuda, M.; Hasegawa, T.; Morii, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12932.

第二章

リン酸化チロシンを特異的に認識する RNA-ペプチド複合体の創製

概要

タンパク質リン酸化酵素によるタンパク質中のチロシン残基あるいはセリン・スレオニン残基のリン酸化反応を選択的に認識し検出する分子ツールは、細胞内シグナル伝達経路を理解するために必要である。RNA とペプチドから形成される安定な複合体は、機能性 RNA 分子 (RNA アプタマー) と同様に有機小分子に対してテーラーメイドなリセプターが作製できる。RNA ライブラリーとペプチドとの複合体から形成されるリボヌクレオペプチドライブラリーを基に、*in vitro* セレクション法を用いてリン酸化チロシンに対して特異的に認識するリボヌクレオペプチドリセプターの作製を行った。リン酸化チロシンに結合するリボヌクレオペプチドリセプターは、チロシンやリン酸化セリンを識別した。ATP 以外のシグナル分子に対して、リボヌクレオペプチドリセプターの作製法が適用可能であることを示した。

2-1 緒言

タンパク質リン酸化酵素によるタンパク質表面に局在するチロシン残基あるいはセリン・スレオニン残基のリン酸化反応 (図2-1) は、細胞内シグナル伝達経路におけるタンパク質-タンパク質相互作用の制御とタンパク質酵素活性のオンとオフの切り換えにおいて極めて重要な役割を果たしていることが、分子生物学と生化学の著しい進歩によって明らかになってきた[1, 2]。リン酸化タンパク質表面の選択的な認識と検出は、分子レベルでのタンパク質-タンパク質相互作用様式とタンパク質表面を介したシグナル伝達機構の解明に必要とされている[3]。複雑なシグナル伝達経路を理解するためには、特定のリン酸化タンパク質に対して選択的に認識する分子ツールを開発するだけでなく、任意のリン酸化タンパク質を特異的に識別できる用途の広い方法論が望まれている[4-6]。リン酸化反応を行うタンパク質リン酸化酵素は、標的となるアミノ酸配列に対して特異的であり、リン酸化されるチロシン残基またはセリン・スレオニン残基の隣接する残基 (酸性、塩基性、疎水性) の影響を受けている[7]。配列特異的

なタンパク質リン酸化部位は細胞内において多数存在することから、生物学的な活性部位の予測あるいはタンパク質の一次配列からのリン酸化部位の予測は困難である。特定のリン酸化部位をもつタンパク質に対してテラーメイドなリセプターを構築する方法論は、細胞内シグナル伝達経路についてさらに理解を深めるだけでなく、シグナル伝達機構を解明するために必要な技術である。

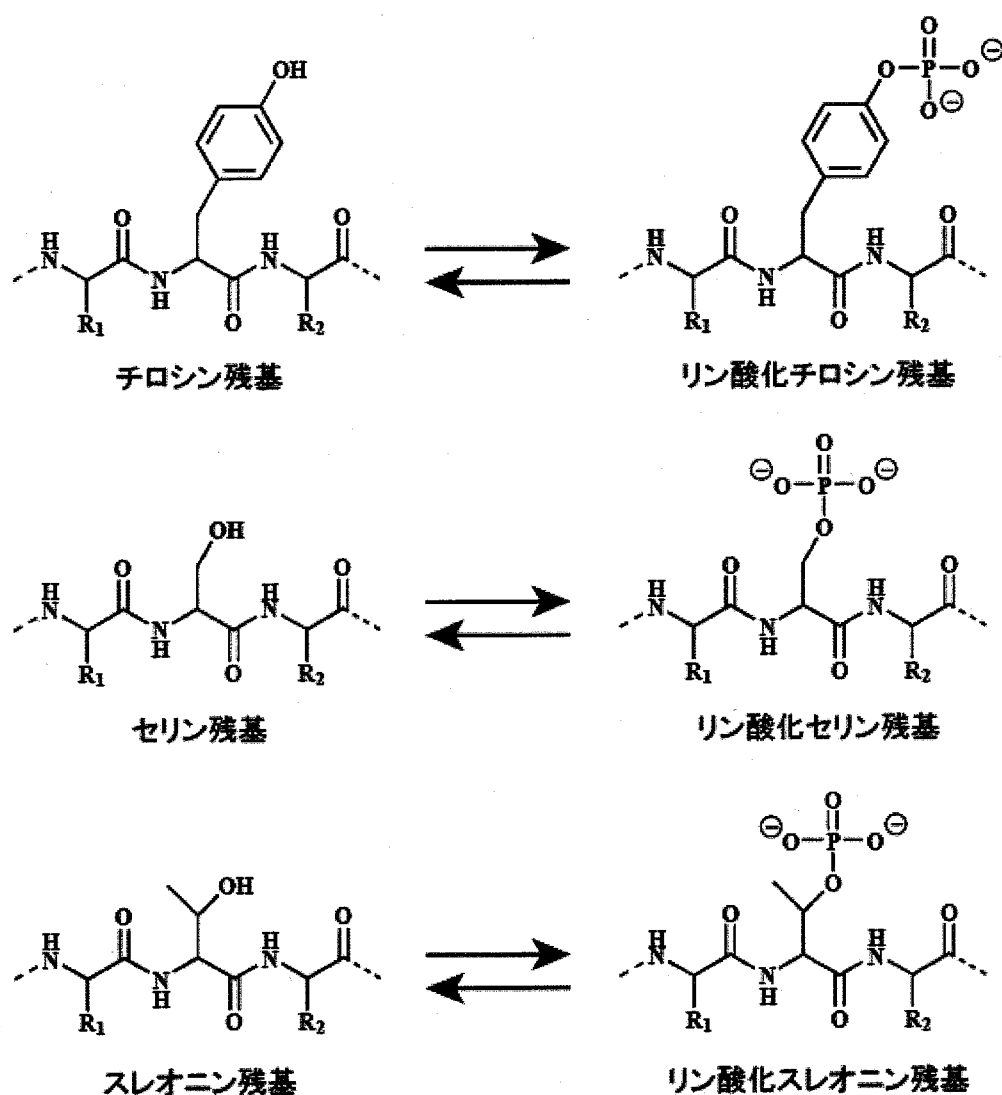


図2-1 タンパク質中のリン酸化をうけるアミノ酸残基の化学構造

生体内において生命維持に必須であるタンパク質を合成する RNA-タンパク質複合体リボソームの化学反応の触媒作用様式が X 線結晶構造解析により解明されつつある[8, 9]。伝令 RNA のもつ塩基情報に則して、アミノ酸が連なったペプチド鎖を生合成するという複雑な化学反応の触媒作用様式の活性中心は RNA が担っており、タンパク質は RNA の構造安定化に伴う重要な機能を発揮すると示唆されている。さらに RNA 酵素として知られるリボザイムも生体内ではタンパク質と複合体を形成して機能を発揮する点からも、RNA-タンパク質複合体は RNA アプタマー[10-13]と同様にテラーメイドなリセプターや酵素をはじめとする機能性生体高分子の創製には、有用な鋳型分子であると期待できる。

2002 年に森井ら[14]は、三次元構造情報に基づいたリボヌクレオペプチドの分子設計と合目的なライブラリー法による機能化法を組み合わせたテラーメイドな生体高分子リセプターの作製法を開発した。ATP に対して高い親和性と基質特異性を有するリボヌクレオペプチドリセプターは、1996 年に Williamson ら[15]により構造解析されたヒト免疫不全ウイルス(HIV)由来の Rev ペプチドと RRE(Rev Response Element: Rev ペプチド結合領域)由来の RNA の複合体構造を基本骨格として分子設計し、*in vitro* セレクション法を適用することで作製されている。リボヌクレオペプチドリセプターの詳細な分子設計は、RRE RNA 配列中の A52・U64 塩基対までの Rev ペプチド結合領域のステム領域を保存し、G53 から C65 までのループ領域に ATP 結合部位としてランダムな塩基を導入することによって設計されている(図2-2)。

ランダムな配列が 100 塩基前後からなるライブラリーから選択された RNA アプタマーと基質分子との複合体の三次元構造では、高度に保存された 30 塩基前後のヌクレオチドが基質分子と直接相互作用している結合様式が観測される[16-20]。このことから 30 塩基前後のランダムな塩基配列を基質結合領域としてリボヌクレオペプチドに導入した場合でも、十分な基質選択性と結合活性を発揮する基質結合場が作製可能であると推察される。ATP に対して高い基質選択性と結合活性を示すリボヌクレオペプチドリセプターは、ランダムな 20 もしくは 30 塩基を含んだ RNA ライブラリーから作製され[14, 21]、ATP 結合性 RNA アプタマー[22]とは異なる保存配列を有していた。リボヌクレオペプチド機能化法は、RNA アプタマーとは異なる分子認識場の構築が可能な方法論であることが示された。

これまでに、リン酸化チロシンを認識する人工リセプターとして、シクロデキストリンにグアニジノ基を導入した人工リセプター[23]が報告されている。シクロデキストリンを基にした人工リセプターは、リン酸

The diagram illustrates the process of RNA secondary structure prediction. It shows a 3D model of an RNA molecule on the left, followed by a linear sequence of nucleotides in the middle, and a predicted secondary structure on the right. The linear sequence is labeled with '53 番目' (53rd position) and '65 番目' (65th position). The predicted structure is divided into a 'ランダム領域' (Random region) and a 'ステム領域' (Stem region).

Linear Sequence:

53 番目: 5'-C G C A C G C G G G U-3'

65 番目: 5'-A C G U C G G A C A G-3'

Predicted Secondary Structure:

ランダム領域: 5'-C G C A C G C G G G U-3'

ステム領域: 5'-A C G U C G G A C A G-3'

acetyl-TRQARRNRRRRWRERQR-amide

(A) RNA サブユニットのランダム塩基の導入部位: 53 番目から 63 番目の塩基の代わりにランダムな塩基を導入する。

(B) 本研究で使用した 17 アミノ酸の Rev ペプチドのアミノ酸配列: N 末端をアセチル化、C 末端をアミド化している。

2-2 結果と考察

2-2-1 リン酸化チロシンに対して親和性を有するリボヌクレオペプチドの選択

1990 年に Szostak ら[26]、Gold ら[27]により開発された *in vitro* セクション法をリボヌクレオペプチドに対して適用することで、リン酸化チロシンに対して結合能を有するリボヌクレオペプチドリセプターを得ることにした。シグナル分子リン酸化チロシンに対する選択の過程は、RNA サブユニットにランダムな 30 塩基を有するリボヌクレオペプチドライブラリーを用いて選択を行った(図2-3)。

選択に用いたリボヌクレオペプチドライブラリーは、ランダムな 30 塩基が導入された DNA ライブラリーをもとにして、T7 RNA ポリメラーゼによる転写反応を行うことで RNA ライブラリーに変換した後に、Rev ペプチドを添加し作製した。作製したリボヌクレオペプチドライブラリーをリン酸化チロシンアガロース樹脂に結合させた後、リン酸化チロシンアガロース樹脂を充分に洗浄することで非特異的に結合しているリボヌクレオペプチドの画分を除去した。リン酸化チロシンアガロース樹脂に結合したリボヌクレオペプチドの画分は、リン酸化チロシン水溶液により特異的な溶出により回収した。溶出された RNA は逆転写酵素により DNA に変換し、PCR により増幅した。この逆転写反応、PCR の過程で、リン酸化チロシン結合活性が高められた DNA ライブラリーが作製される。DNA ライブラリーを転写した新たな RNA ライブラリーは、選択する前の RNA ライブラリーと比較すると、リン酸化チロシン結合活性が高まった分子種に濃縮されていると考えられる。このようにして、選択、増幅のサイクルを繰り返す行うことで、リン酸化チロシンに対して高い親和性で結合するリボヌクレオペプチドを選択した。

7 回の選択、増幅を繰り返した RNA ライブラリーにおいて、リン酸化チロシン結合活性が 50 %まで上昇したことから(図2-4)、リボヌクレオペプチドの *in vitro* セクション法が有効に機能していることが示唆されたため、RNA 配列解析を行った(図2-5)。配列解析した 29 クローンの中で、同一配列をもつ二種類の RNA クローンが確認できた。pY03 の RNA 配列が 9 クローンと pY09 の RNA 配列が 5 クローンとが同一配列として観測できた。pY09 は 10 塩基の高度に保存された配列 5'-UGC---GGUAGAA-3'を持つクローンでもあり、保存配列 5'-UGC---GGUAGAA-3'を有する 14 クローンが確認できた。pY09 の保存配列の 5'側と 3'側に反対になった保存配列 5'-GGUAGAA---UGC-3'を有する 5 クローンも認められた。

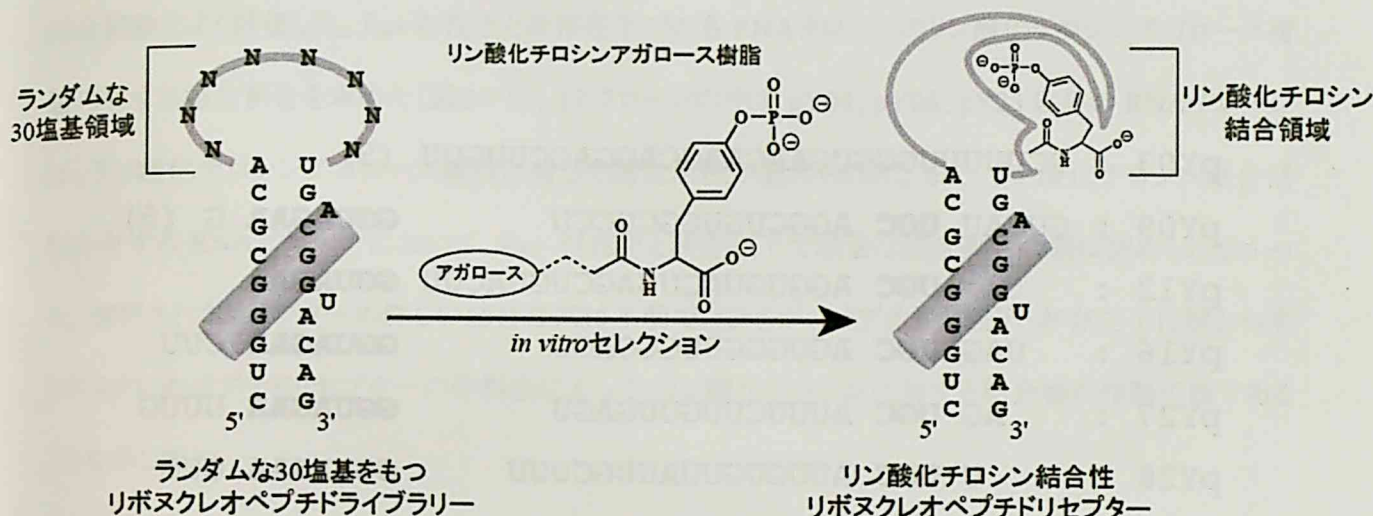


図2-3 リン酸化チロシンに対して結合するリボヌクレオペプチドの模式図
(ランダムな 30 塩基領域をもつリボヌクレオペプチドの中から、リン酸化チロシンアガロース樹脂に対して結合する分子種を選択する。)

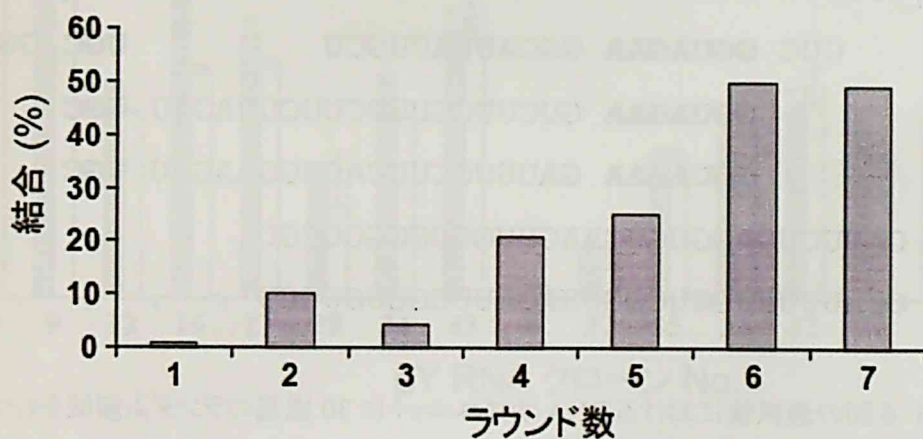


図2-4 各ラウンドにおけるリン酸化チロシンアガロース樹脂に対する
リボヌクレオペプチドライブラリーの結合割合
(リン酸化チロシンアガロース樹脂に加える前のリボヌクレオペプチドの吸光度と、リン酸化チロシンアガロース樹脂に加えた後の素通り画分の吸光度を測定して、非結合画分の結合割合を求めることによって、リン酸化チロシンアガロース樹脂に対するリボヌクレオペプチドの結合割合を算出した。)

pY03 : UCUUUUUGGGUGAACAAGCAGGACCUUGUU (9)
 pY09 : GUCAU **UGC** AGGCUGUGGCUCCU **GGUAGAA** G (5)
 pY12 : **UGC** AGGUGUACUGAGCUGUACUU **GGUAGAA**
 pY16 : UAG **UGC** AGUGCGUUGGCAGU **GGUAGAA** CUU
 pY27 : AG **UGC** AUUUCUUGUUGAGU **GGUAGAA** UUUG
 pY28 : U **UGC** AUUGUGUUAUUGCUUU **GGUAGAA** GUG
 pY34 : **UGC** AUCUUCUUGAUUUUGGGGAU **GGUAGAA**
 pY43 : UGU **UGC** AUUCGCGU **GGUAGAA** GCAUGACGU
 pY04 : **UGC** AGCGGUAUCUUGGCACCGUU **GGUAGAU**
 pY37 : AUACU **UGC** CGGUGCGCCG **GGUAGAA** GGUUU
 pY35 : AGAU **GGUAGAA** GCGGUUGACCGU **UGC** GUCU
 pY36 : CUGUCU **GGUAGAA** GCGCGUUUU **UGC** GUUGC
 pY32 : CUC **GGUAGAA** GGCAUUAUUGCU **UGC** GGGAU
 pY21 : **GGUAGAA** GUCUUCGUUUCUUCUAGAU **UGC**
 pY29 : **GGUAGAA** GAUUUCCUUUAGUGGAAGUU **UGC**
 pY06 : CAUUCUGAGGUGUGAAGUUGGUGGGCCCGC
 pY25 : UUAUUUUUGCUCCGUUAGAUUCGGUGUGCU

図2-5 6回の選択後におけるRNAサブユニットに30塩基のランダム領域をもつ
 リボヌクレオペプチドライブラリーのRNA配列
 (括弧内に示す数字は同じ配列をもつコロニー数、太字で示すのは保存配列)

2-2-2 リン酸化チロシン結合性リボヌクレオペプチドの特性

選択された 17 種類の RNA クローンのリン酸化チロシン結合活性を ^{32}P ラベル化した RNA を用いて結合試験により評価した。Rev 存在下と非存在下での各 RNA クローンのリン酸化チロシンアガロース樹脂に対する結合割合を求めた(図2-6)。17 クローンの中で pY04、pY06、pY25 以外の RNA クローンは、リン酸化チロシンアガロース樹脂に対して結合活性が認められた。また、リン酸化チロシン結合活性を有する RNA クローンにおいて、Rev 存在下と非存在下で顕著な結合割合の差は認められなかった。選択されたリセプターの詳しい結合様式は不明ではあるが、ペプチド存在下・非存在下に関わらずリボヌクレオペプチドリセプターの作製法によって、リン酸化チロシンに対する結合場が作製可能であることを示した。

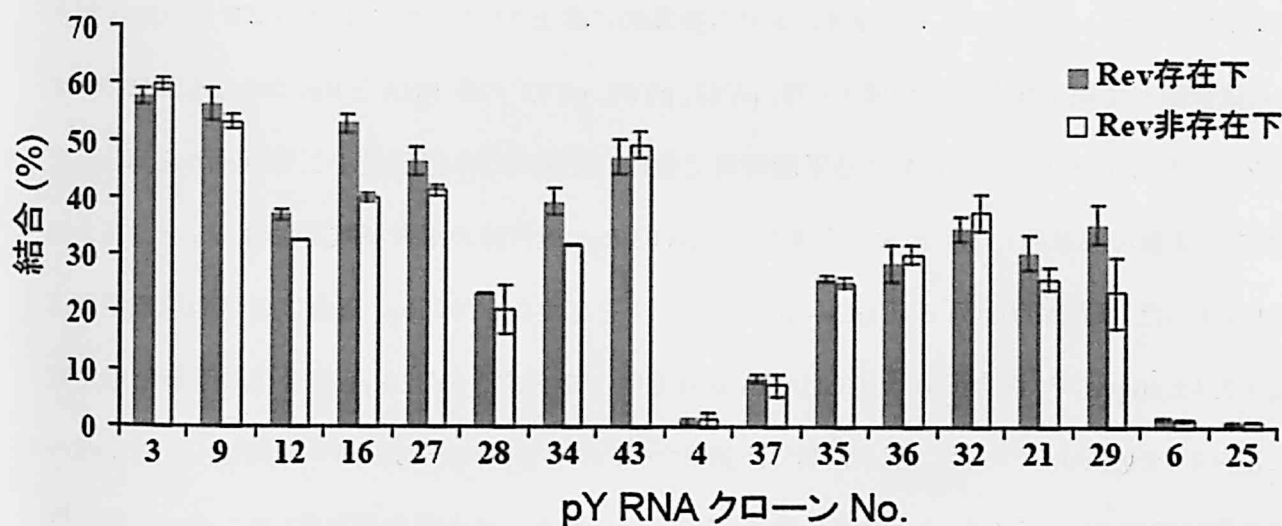


図2-6 リン酸化チロシンアガロース樹脂に対する各 RNA クローンの

Rev 存在下・非存在下における結合割合

[黒色の縦棒は Rev 存在下での結合(%)を示し、白色の縦棒は Rev 非存在下での結合(%)を示す。]

2-2-2 リン酸化チロシン結合性リボヌクレオペプチドの特性

選択された 17 種類の RNA クローンのリン酸化チロシン結合活性を ^{32}P ラベル化した RNA を用いて結合試験により評価した。Rev 存在下と非存在下での各 RNA クローンのリン酸化チロシンアガロース樹脂に対する結合割合を求めた(図2-6)。17 クローンの中で pY04、pY06、pY25 以外の RNA クローンは、リン酸化チロシンアガロース樹脂に対して結合活性が認められた。また、リン酸化チロシン結合活性を有する RNA クローンにおいて、Rev 存在下と非存在下で顕著な結合割合の差は認められなかった。選択されたリセプターの詳しい結合様式は不明ではあるが、ペプチド存在下・非存在下に関わらずリボヌクレオペプチドリセプターの作製法によって、リン酸化チロシンに対する結合場が作製可能であることを示した。

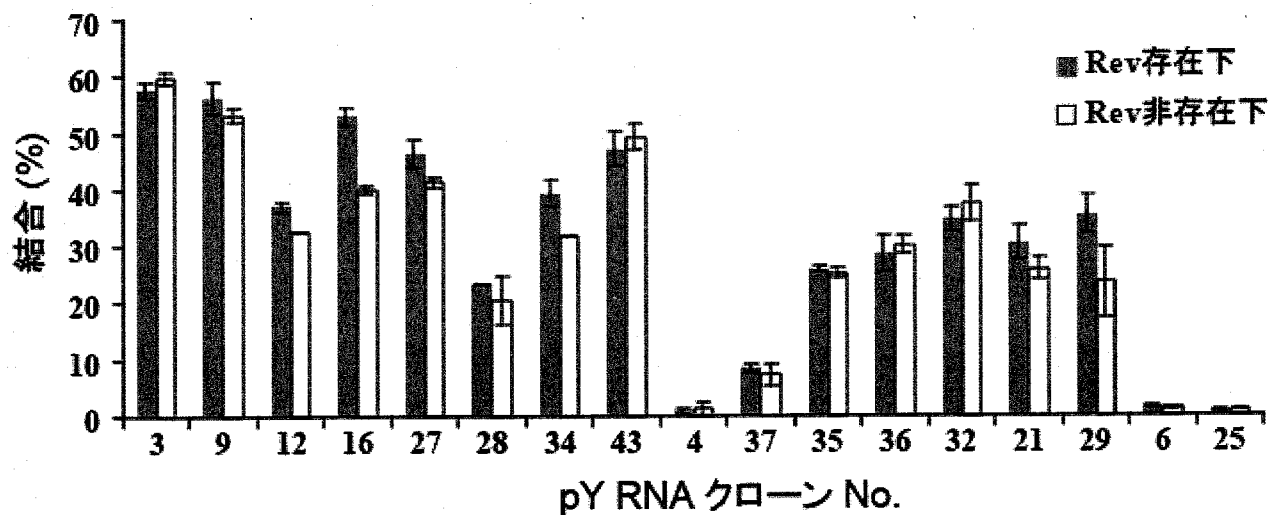


図2-6 リン酸化チロシンアガロース樹脂に対する各 RNA クローンの
Rev 存在下・非存在下における結合割合

[黒色の縦棒は Rev 存在下での結合(%)を示し、白色の縦棒は Rev 非存在下での結合(%)を示す。]

2-2-3 リン酸化チロシン結合性リボヌクレオペプチドリセプターの親和性評価

29 個中 9 個の同一配列が認められた pY03、29 個中 5 個の同一配列が認められた pY09、pY09 とは保存配列 5'-UGC---GGUAGAA-3' の 5' 側と 3' 側が逆に位置するクローンの中で一番結合活性の高かった pY32 の 3 個のクローンについて、リン酸化チロシンに対するリボヌクレオペプチドの結合親和性を検討した。リボヌクレオペプチドとリン酸化チロシンとの複合体の結合親和性は、pY03、pY09、pY32 の各 RNA を Rev ペプチドと複合体を形成させ、リン酸化チロシンアガロース樹脂の濃度を変化させることで、リン酸化チロシンアガロース樹脂に対して結合したリボヌクレオペプチドの結合割合を測定することによって評価した。

^{32}P ラベル化されたリボヌクレオペプチドをリン酸化チロシンアガロース樹脂に加え、結合バッファーで結合しないリボヌクレオペプチドを洗浄することで、リン酸化チロシンに対して非特異的な結合するリボヌクレオペプチドを除去した後に、結合バッファー中に含まれるリン酸化チロシンを用いた競合的な溶出により、リン酸化チロシンアガロース樹脂に結合したリボヌクレオペプチドの割合を測定した。リン酸化チロシンアガロース樹脂の各々の濃度における特異的に溶出されたリボヌクレオペプチドの結合割合から結合飽和曲線が与えられた (図 2-7)。pY03、pY09、pY32 の各 RNA と Rev からなるリボヌクレオペプチドのリン酸化チロシンに対する平衡解離定数は、理論式の非線形最小二乗回帰から算出した (章末の実験の部参照)。最も親和性が高かった pY03/Rev 複合体の平衡解離定数は、 $K_d = 376 \pm 20 \mu\text{M}$ であった。また保存配列 5'-UGC---GGUAGAA-3' を有する pY09/Rev 複合体の平衡解離定数は $K_d = 754 \pm 40 \mu\text{M}$ で、保存配列 5'-GGUAGAA---UGC-3' を有する pY32/Rev 複合体の平衡解離定数は $K_d = 1.4 \pm 0.1 \text{ mM}$ であった。配列解析した 29 クローンの中で 9 クローンの同一配列をもつ pY03/Rev 複合体は選択されたライブラリー中に一番多く存在し、一番高い結合親和性を示したことから、親和性を指標とした選択法が有効に機能することが示唆できた。

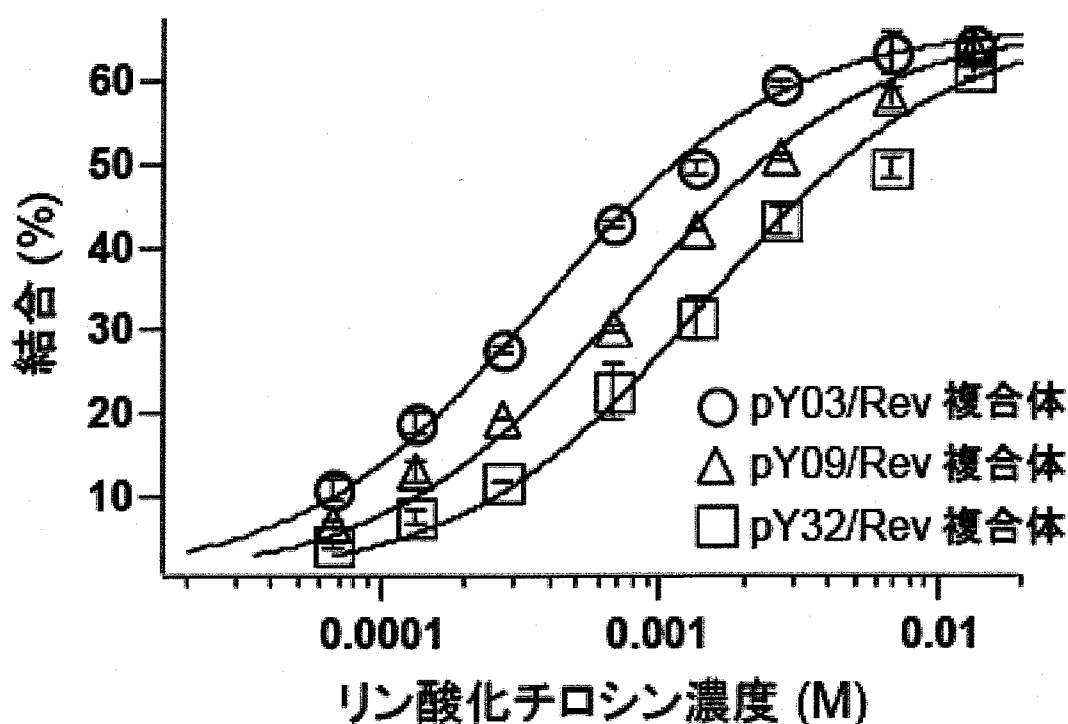


図2-7 リボヌクレオペプチドリセプターのリン酸化チロシンに対する結合親和性評価
(各リン酸化チロシン濃度における pY03/Rev 複合体(丸)、pY09/Rev 複合体(三角)、pY32/Rev 複合体(四角)の結合割合を示す。)

2-2-4 リン酸化チロシン結合性リボヌクレオペプチドリセプターの選択性

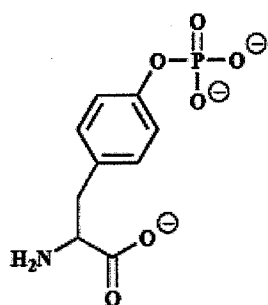
リボヌクレオペプチドリセプターのリン酸化チロシン認識様式を調べるために、リン酸化チロシンと構造的に類似した分子(図2-8)を用いて競合試験により選択性を評価した。競合試験に使用した競合物質は、リン酸化チロシン(pTyr)の誘導体であるリン酸化セリン(pSer)、グリシル-チロシン(Gly-Tyr)、ロイシル-リン酸化チロシン(Leu-pTyr)、グリシル-リン酸化チロシン(Gly-pTyr)を用いた。各競合物質存在下でのリン酸化チロシンアガロース樹脂に対する³²Pラベル化されたpY03/Rev複体の結合割合を比較することによって選択性を評価した(図2-9)。

pY03/Rev複合体は、リン酸化チロシンに対して特異的な結合阻害が認められたことから、リン酸化チロシンを特異的に認識するリセプターであることが示唆できた。さらに、選択時に使用したリン酸化チロシンアガロース樹脂は、リン酸化チロシンのN端側がアルキル鎖でアガロース樹脂に固定化されている

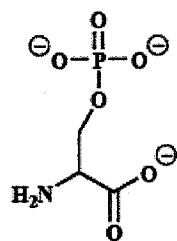
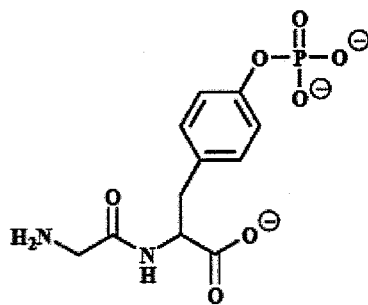
可能性が高いことから、グリシル-リン酸化チロシンに対しても競合試験を行ったところ、リン酸化チロシンと同程度の結合阻害が認められた。この結果から、pY03/Rev 複合体に対するリン酸化チロシンとグリシル-リン酸化チロシンの親和性は、同程度である可能性が示唆できた。

一方、グリシル-チロシンが特異的な結合阻害が認められないことから、リン酸化チロシンのリン酸基は、リン酸化チロシンとリボヌクレオペプチドの特異的な複合体形成に寄与していることが明らかになった。また、リン酸化セリンも結合阻害をうけなかったことより、リン酸化チロシンの芳香環も基質結合場における認識に関与することが示唆できた。さらに、pY03/Rev 複合体は、ロイシル-リン酸化チロシンと結合阻害をうけないことより、リン酸化チロシンの N 端側も特異的に認識するリボヌクレオペプチドリセプターであることが明らかになった。

リン酸化チロシン (pTyr)

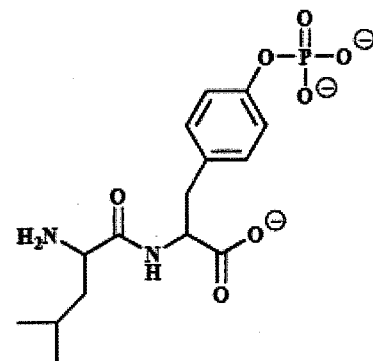
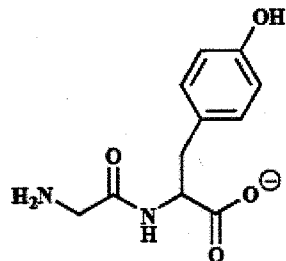


グリシル-リン酸化チロシン (Gly-pTyr)



リン酸化セリン (pSer)

グリシル-チロシン (Gly-Tyr)



ロイシル-リン酸化チロシン (Leu-pTyr)

図2-8 本研究で使用した競合物質の化学構造

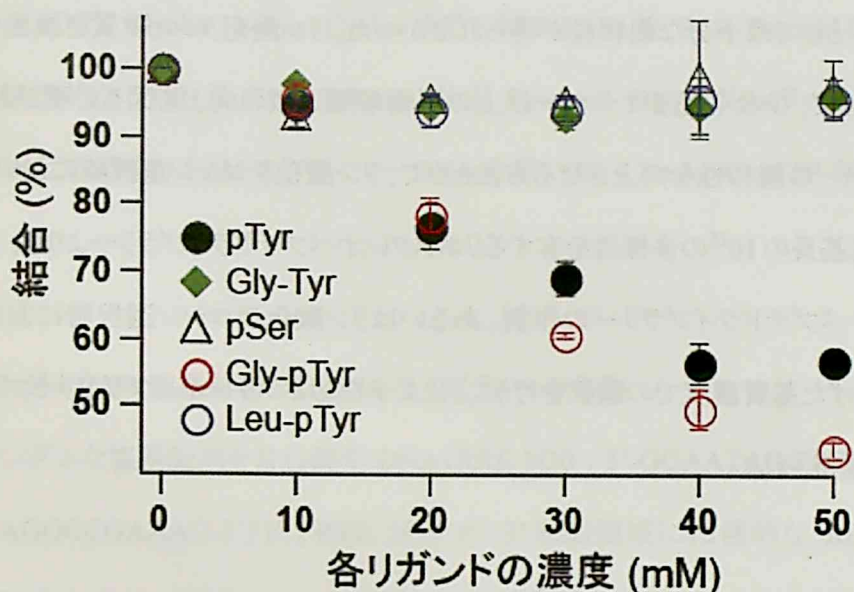


図2-9 pY03/Rev 複合体の競合試験結果

[各リガンド濃度共存下における pY03/Rev 複合体のリン酸化チロシンアガロース樹脂に対する結合割合:各リガンド濃度のデータポイントは、pTyr(黒丸)、Gly-Tyr(緑ダイヤ)、pSer(白三角)、Gly-pTyr(赤丸)、Leu-pTyr(青丸)で示す。]

2-3 結論

三次元構造情報を基にした分子設計と *in vitro* セレクション法を組み合わせたリボヌクレオペプチド機能化法により、リン酸化チロシンに対して高選択的に結合するリボヌクレオペプチドリセプターが作製できた。リン酸化チロシンを特異的に認識するリボヌクレオペプチドリセプターは、これまでに報告されているチロシン結合活性を示す RNA アプタマー[24, 25]とは類似性のない配列を有することから、チロシン結合場よりも基質結合場が拡張されたリン酸化チロシン結合場が、リボヌクレオペプチド機能化法により構築できることを示した。

pY03/Rev 複合体は、シクロデキストリンにグアニジノ基を導入した人工リセプター[23]とは異なり、リン酸化チロシンの芳香環とリン酸基を高選択的に識別できるリセプターであった。このことから、リボヌクレオペプチド機能化法が、ATP 以外のシグナル分子に対しても精緻な分子認識場を作製する方法論として、より一般的な方法論であることを示した。しかし、リン酸化チロシンを特異的に認識するリボヌクレオペプチドリセプターの平衡解離定数が 376 μM であったことから、リン酸化タンパク質を検出する実

用的な分子ツールとしては十分な親和性が得られなかった。リン酸化タンパク質を検出する為の実用的な分子ツールとして、少なくとも2オーダー以上の平衡解離定数の向上を図る必要がある。リボヌクレオペプチドリセプターの親和性を向上させる方法として、リン酸化チロシン選択時において使用したランダム領域が30塩基長の 10^{18} の多様性を有するリボヌクレオペプチドライブラリーよりも、多様性を拡張させたリボヌクレオペプチドライブラリーの作製、あるいはリン酸化チロシン選択時における基質濃度13.4 mM よりも下げた基質濃度での選択を行うことによって、リボヌクレオペプチドリセプターの親和性が向上することが期待される。

2-4 実験の部

2-4-1 試薬

側鎖を保護した Fmoc (9-fluorenylmethoxycarbonyl) アミノ酸は渡辺化学工業社から、Fmoc-PAL-PEG 樹脂、HATU (*N*-[(dimethylamino)-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridin-1-ylmethylene]-*N*-methylmethanaminium hexafluorophosphate *N*-oxide)は Applied Biosystems 社から、ペプチド合成用 DMF は渡辺化学工業社から購入した。リン酸化チロシンアガロース樹脂、*O*-phospho-*L*-Tyrosine は Sigma-Aldrich 社から購入した。Klenow DNA ポリメラーゼ、制限酵素 (*Bam*HI、*Eco*RI)、T4 polynucleotide キナーゼは New England Biolab 社から購入した。Pyrobest DNA ポリメラーゼ、TaKaRa Ligation Kit Ver.2 は TaKaRa 社から購入した。ライブラリー作製用 DH5 α コンピテントセルは Invitrogen 社から購入した。逆転写酵素[AMV (Avian Myeloblastosis Virus) Reverse Transcriptase]は Promega 社から購入した。RNA 転写キット (Ampli Scribe T7 High Yield Transcription Kit)は Epicentre 社から購入した。Bacto Trypton、Yeast Extract、Bacto Agar はナカライテスク社より購入した。DNA ライブラリー用の DNA の合成は Amersham Pharmacia 社に依頼した。PCR プライマー用の DNA の合成は Gene Design 社に依頼した。放射性アイソトープは Amersham Pharmacia 社から購入した。QIAprep Spin Mini Prep Kit は Qiagen 社から購入した。その他の試薬は分子生物学用もしくは特級のものを使用した。

PCRはBIO-RAD社 iCycler Thermal Cycler あるいはTaKaRa社 PCR Thermal Cycler PERSONALを使用した。標準的なPCR反応は、TaKaRa社のPyrobest DNAポリメラーゼを用いて、添付のPyrobest Buffer反応液中0.5 μ MのプライマーDNAを用いて、0.2 mMのdNTP存在下の条件で行った。

2-4-2 ランダムな30塩基を有するDNAライブラリーの作製

30塩基のランダムな塩基配列を含む鋳型DNA(RRE N30: 5'-GGAATAGGTCTGGGCGCA(N₃₀)TGACGGTACAGGCCGAAAG-3')に、RRE N30の3'末端領域に相補的なREV 01プライマー(5'-CTTT CGGCCTGTACCGTCA-3')を90℃で3分温置後、氷上で5分間静置させてから、Klenow DNAポリメラーゼにより37℃、60分間の反応により2本鎖DNAを合成した。65℃で5分間温置することによりKlenow DNAポリメラーゼを熱失活させた。次にT7プロモーターを含むFOR 01プライマー(5'-TCTAATACGACTCACTATAGGAATAGGTCTGGGCGCA-3')、REV 01プライマーを用いて、変性94℃、30秒、アニーリング55℃、30秒、伸長反応72℃、1分の条件により4サイクルのPCRを行うことで、ランダムな30塩基を含む2本鎖DNAライブラリーを構築した。

2-4-3 ランダムな30塩基を有するRNAライブラリーの作製

1 μ gの2本鎖DNAライブラリーを鋳型として用い、Epicentre社Ampli Scribe T7 High Yield Transcription Kitを用いて、20 μ Lの容量で37℃で3時間反応させることによりRNAへ転写した。転写反応終了後、1 UのDNaseIを加え37℃で15分間反応を行い、鋳型DNAを分解した。転写したRNAは酢酸ナトリウム存在下エタノール沈殿を行った。RNAサンプルは90%ホルムアミド水溶液に溶解し、80℃で3分間の熱処理を行った後、氷上で急冷して変性させ、6 M尿素を含んだ8%ポリアクリルアミド変性ゲルにより精製した。TLC板の上でUVを照射し目的分子量のRNAのバンドを確認した上で切り出し、TE緩衝液[10 mM Tris-HCl (pH 7.6)、1 mM EDTA]で4℃、12時間抽出した。抽出したRNAは酢酸ナトリウム存在下エタノール沈殿を行った。精製したRNAは10 μ Mとなるように10 mM Tris-HCl (pH 7.6)、150 mM NaClを含んだバッファーに希釈し80℃で3分加熱した後、室温まで2時間かけて適切な2次構造を形成するようにした。

2-4-4 Rev ペプチドの合成

Rev ペプチドは Fmoc 固相合成法により化学合成した。樹脂は Fmoc-PAL-PEG resin (0.38 mmol/g) を用いた。縮合は、樹脂に対して 10 当量の Fmoc アミノ酸、10 当量の HATU を 5 % のジイソプロピルエチルアミンを含む DMF に溶解したものを加え、60 分攪拌することで行った。ペプチドの N 末端の Fmoc 基を除去した後、0.5M 1-メチルイミダゾールと 0.5M 無水酢酸を用いてペプチドの N 末端をアセチル化した。樹脂からの切り出し及び側鎖の脱保護は、フェノール (0.75 g)、チオアニソール (0.5 mL)、エタンジチオール (0.25 mL)、蒸留水 (0.5 mL)、トリフルオロ酢酸 (10 mL) の混合溶液を、氷上乾燥させた樹脂に加え、3 時間攪拌した。反応終了後、樹脂をろ別し、エーテル沈殿により Rev ペプチドを回収した。沈殿を水に溶解させ、エーテルによる洗浄後、10 % 酢酸水溶液を溶離液としてゲルろ過 (Sephadex G-10) 精製を行った後、逆相 HPLC により精製した (溶離液 A: 0.2 % トリフルオロ酢酸水溶液、溶離液 B: 0.2 % トリフルオロ酢酸を含む 50 % アセトニトリル水溶液)。ペプチドの同定には Voyager MALDI-TOF マススペクトル (Applied Biosystems) を用いた。Rev ペプチドの理論値 2478.8 に対して測定値 2480.5 で得た。

2-4-5 リン酸化チロシンに対して親和性を有するリボヌクレオペプチドの選択

結合実験には 4 % beaded アガロースに固定されたリン酸化チロシン樹脂 (13.4 $\mu\text{mol/ml}$ 樹脂容量) を用いた。樹脂は予め結合バッファー [10 mM Tris-HCl (pH 7.6)、100 mM KCl、5 mM MgCl_2] により、樹脂容量の 3 倍量の結合バッファーで 3 回洗浄することにより平衡化した。100 μL 樹脂容量のリン酸化チロシンアガロース樹脂に、2 μM の RNA、3 μM Rev ペプチドを含む 100 μL の混合液を加え、氷上で 30 分間時々攪拌しながら結合させた。結合反応後、上澄を除いた後、樹脂は 300 μL の結合バッファーで、5000 g、4 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分間遠心し、上澄を除去する操作を 3 回繰り返して洗浄した。樹脂に結合した RNA は、1 mM リン酸化チロシンを含んだ結合バッファー 100 μL で溶出させ、これを 3 回繰り返し、酢酸ナトリウム存在下エタノール沈殿を行い RNA を回収した。

10 μL の TE 緩衝液に RNA を溶解させた溶液から 3 μL の RNA を鋳型として、12 μM の REV 01 プライマー存在下で 80 $^{\circ}\text{C}$ 、3 分間加熱し、30 分間かけて 25 $^{\circ}\text{C}$ まで徐冷しアニーリングさせた後、逆転写酵素を反応液中に加え逆転写反応 (42 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間) を行った。20 μL の反応溶液を 99 $^{\circ}\text{C}$ 5 分間加

熱処理し逆転写酵素を失活させた後、反応液の 1/10 量について REV 01、FOR 01 プライマーを用いて、変性 94 °C、30 秒、アニーリング 55 °C、30 秒、伸長反応 72 °C、1 分の条件で PCR を行った。4 サイクル毎に 20 サイクルまで反応液を分取し、8 %非変性ポリアクリルアミド(アクリルアミド:ビスアクリルアミド=29:1)電気泳動により増幅 DNA を分析した。ポリアクリルアミド電気泳動での分析により、指数的に DNA の増幅が確認される最小のサイクル数で PCR を行い、新たな DNA ライブラリーを調製した。PCR 産物は、酢酸アンモニウム溶存在下 2-プロパノール沈殿により精製し、次のセレクションに供した。

2-4-6 選択されたリボヌクレオペプチドの RNA 配列解析

選択を行った DNA ライブラリーについて、制限酵素の切断領域を付加するために、制限酵素切断領域を有する FOR 02 プライマー(5'-CGgaattcTAATACGACTCACTATAGG-3'、小文字表記は *EcoRI* 認識配列を示す)、REV 02 プライマー(5'-GCGggtaccTTTCGGCCTGTACCGTCA-3'、小文字表記は *BamHI* 認識配列を示す)を用いて PCR を行った。PCR は 100 µL の反応容量で鋳型 DNA 100 ng を用いて変性 94 °C、30 秒、アニーリング 55 °C、30 秒、伸長反応 72 °C、1 分の条件で 4 サイクル行った。PCR 産物は、酢酸アンモニウム溶存在下 2-プロパノール沈殿により精製した後、*BamHI*、*EcoRI* により 37 °C で 2 時間酵素反応を行った。酵素消化後、フェノール、クロロホルム処理を行い、酢酸ナトリウム存在下エタノール沈殿により精製した。

予め *BamHI*、*EcoRI* 反応により切断した pUC19 プラスミド DNA に対し、3 倍モル量の PCR 産物を加え、TaKaRa Ligation Kit Ver.2 により 16 °C、30 分ライゲーション反応を行った。ライゲーションサンプルをそのまま DH5αコンピテントセルに加え形質転換を行い、LB アンピシリン培地上で一晩培養した。形質転換した大腸菌は、アンピシリンを含んだ 4 mL の液体 LB 培地にて培養した。16 時間培養した培養液を 3000 rpm、10 分間遠心分離し大腸菌を回収した。回収した大腸菌は Qiagen Mini Prep Kit のプロトコールに従って、プラスミド DNA を回収した。

2-4-7 クローニングを行ったプラスミド DNA の配列解析

回収したプラスミド DNA (200 ng)、M13 RV プライマー(5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'、1.6 pmol)、Big Dye Terminator プレミックス液 2 µL を反応容量 10 µL となるように混合し、変性 96 °C 30

秒、アニーリング 50 °C 15 秒、伸長反応 60 °C 2 分の条件で 25 サイクル反応を行った。反応終了後、酢酸ナトリウム溶液存在下エタノール沈殿により精製した。1.5 µL のシーケンス用ローディング溶液に溶解させ、95 °C で 2 分処理した後、氷上で急冷し、解析に使用した。DNA 配列解析は Applied Biosystems 社の自動 DNA 配列解析装置 (ABI Model 377) を使用した。

2-4-8 配列解析を行ったプラスミド DNA から RNA の調製

配列確認を行ったプラスミド DNA 2 ng を用い 100 µL の容量で、FOR 03 プライマー (5'-GAATTCT AATACGACTCACTATAGG-3')、REV 01 プライマーを用いて変性 94 °C 30 秒、アニーリング 55 °C 30 秒、伸長反応 72 °C 1 分の条件で 30 サイクル反応を行った。PCR 産物は酢酸アンモニウム存在下 2-プロパノール沈殿を行った。精製した DNA は TE 緩衝液に溶解し、前述した方法により RNA を転写した後、変性ゲルを用いて精製した。

2-4-9 RNA の 5'末端標識

5'末端を標識する RNA は、脱リン酸化酵素 CIAP (New England Biolab 社) を用いて 5'末端を脱リン酸化した。脱リン酸化後、フェノール/クロロホルム処理を行い、酢酸ナトリウム存在下エタノール沈殿により精製した。[γ -³²P] ATP (~6000 Ci/mmol) と T4 polynucleotide キナーゼを用いて 37 °C で 30 分間反応させることにより RNA の 5'末端の標識を行った。標識後、6 M 尿素を含んだ 8 %変性ポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド:ビスアクリルアミド=29:1) により精製した。RNA は TE 緩衝液中に室温下 3 時間かけて溶出させた。抽出した RNA は酢酸ナトリウム存在下エタノール沈殿を行い精製した。

2-4-10 リボヌクレオペプチドリセプターとリン酸化チロシンアガロース樹脂の結合試験

樹脂量として 20 µL のリン酸化チロシンアガロース樹脂に RNA (最終濃度 1 µM) と Rev ペプチド (最終濃度 1 µM) を加えた結合バッファー [10 mM Tris-HCl (pH7.6)、100 mM KCl、5 mM MgCl₂] 中、反応液 20 µL を氷上 30 分間反応させた。反応液を 5000 g、4 °C で 1 分間遠心により濾過した後、樹脂は 150 µL の結合バッファーで、5000 g、4 °C で 1 分間遠心する操作を 3 回繰り返して洗浄した。樹脂に結合した RNA は、1 mM リン酸化チロシンを含んだバッファー 100 µL で溶出させ、これを 3 回繰り返した。

洗浄液中、回収液中、さらに樹脂の放射活性をチェレンコフ法により測定し、それぞれを非結合画分、特異的結合画分、非特異的結合画分とした。結合反応に用いた RNA の放射活性に対し、得られた RNA の放射活性から非結合画分(%）、特異的結合画分(%）、非特異的結合画分(%)を算出した。

2-4-11 リボヌクレオペプチドリセプターとリン酸化チロシンの平衡解離定数の測定

各樹脂容量のリン酸化チロシンアガロース樹脂に RNA (最終濃度 1 μ M) と Rev ペプチド (最終濃度 1 μ M) を加えた結合バッファー [10 mM Tris-HCl (pH7.6)、100 mM KCl、20 mM MgCl₂] 中、反応液 20 μ L を氷上 30 分間反応させた。反応液を 1000 g、4 $^{\circ}$ C で 1 分間遠心によりろ過した後、樹脂は 150 μ L の結合バッファーで、1000 g、4 $^{\circ}$ C で 1 分間遠心する操作を 3 回繰り返して洗浄した。樹脂に結合した RNA を 1 mM リン酸化チロシンを含んだバッファー 100 μ L で溶出し、これを 3 回繰り返した。洗浄液中、回収液中、さらに樹脂の放射活性をチェレンコフ法により測定し、それぞれ非結合画分、特異的結合画分、非特異的結合画分とした。結合反応に用いた RNA の放射活性に対し、得られた RNA の放射活性から非結合画分(%）、特異的結合画分(%）、非特異的結合画分(%)を算出した。リボヌクレオペプチドリセプターのリン酸化チロシンとの平衡解離定数 K_d は、以下の理論式に従って算出した。解析ソフトには Igor Pro を用いた。

$$F = ([\text{RNA-ペプチド複合体}] + [\text{リン酸化チロシン}] + K_d) - \{ ([\text{RNA-ペプチド複合体}] + [\text{リン酸化チロシン}] + K_d)^2 - 4 \times [\text{RNA-ペプチド複合体}] [\text{リン酸化チロシン}] \}^{1/2} / 2 \times [\text{RNA-ペプチド複合体}]$$

F はリン酸化チロシンに結合した RNA-ペプチド複合体の結合割合、[] は各濃度を示す。データは平均 \pm 標準偏差により表記した。

2-4-12 リボヌクレオペプチドリセプターの競合試験

樹脂量として 2 μ L のリン酸化チロシンアガロース樹脂に最終濃度 1 μ M となるように RNA、1 μ M Rev を加えたのち結合バッファー [10 mM Tris-HCl (pH7.6)、100 mM KCl、20 mM MgCl₂] 中、各濃度の競合物質を加えた反応液 20 μ L を氷上 30 分間反応させた。反応液を 5000 g、4 $^{\circ}$ C で 1 分間遠心によりろ過した後、樹脂は 150 μ L の結合バッファーで、5000 g、4 $^{\circ}$ C で 1 分間遠心する操作を 3 回繰り返して洗浄した。樹脂に結合した RNA は、1 mM リン酸化チロシンを含んだバッファー 100 μ L で溶出

させ、これを 3 回繰り返した。洗浄液中、回収液中、さらに樹脂の放射活性をチェレンコフ法により測定し、それぞれ非結合画分、特異的結合画分、非特異的結合画分とした。結合反応に用いた RNA の放射活性に対し、得られた RNA の放射活性から非結合画分(%)、特異的結合画分(%)、非特異的結合画分(%)を算出した。

引用文献

- [1] Johnson, L. N.; Lewis, R. J. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2209.
- [2] Chen, Z.; Gibson, T. B.; Robinson, F.; Silvestro, L.; Pearson, G.; Bing-e, Xu; Wright, A.; Vanderbilt, C.; Cobb, M. H. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2449.
- [3] Jackson, M. D.; Denu, J. M. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2313.
- [4] Ojida, A.; Mito-oka, Y.; Inoue, M.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6256.
- [5] Gullick, W. J.; Downward, J.; Waterfield, M. D. *EMBO J.* **1985**, *4*, 2869.
- [6] Salomon, A. R.; Ficarro, S. B.; Brill, L. M.; Brinker, A.; Phung, Q. T.; Ericson, C.; Sauer, K.; Brock, A.; Horn, D. M.; Schultz, P. G.; Peters, E. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 443.
- [7] Blom, N.; Gammeltoft, S.; Brunak, S. *J. Mol. Biol.* **1999**, *294*, 1351.
- [8] Ban, N.; Nissen, P.; Hansen, J.; Moore, P. B.; Steitz, T. A. *Science* **2000**, *289*, 905.
- [9] Nissen, P.; Hansen, J.; Ban, N.; Moore, P. B.; Steitz, T. A. *Science* **2000**, *289*, 920.
- [10] Wilson, D. S.; Szostak, J. W. *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 611.
- [11] Breaker, R. R. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 371.
- [12] Osborne, S. E.; Ellington, A. D. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 349.
- [13] Joyce, G. F. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 791.
- [14] Morii, T.; Hagihara, M.; Sato, S.; Makino, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4617.
- [15] Battiste, J. L.; Mao, H.; Rao, N. S.; Tan, R.; Muhandiram, D. R.; Kay, L. E.; Frankel, A. D.; Williamson, J. R. *Science* **1996**, *273*, 1547.
- [16] Jiang, L.; Patel, D. J. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 769.

- [17] Jiang, F.; Kumar, R. A.; Jones, R. A.; Patel, D. J. *Nature* **1996**, 382, 183.
- [18] Dieckmann, T.; Suzuki, E.; Nakamura, G. K.; Feigon, J. *RNA* **1996**, 2, 628.
- [19] Dieckmann, T.; Butcher, S. E.; Sassanfar, M.; Szostak, J. W.; Feigon, J. *J. Mol. Biol.* **1997**, 273, 467.
- [20] Fan, P.; Suri, A. K.; Fiala, R.; Live, D.; Patel, D. J. *J. Mol. Biol.* **1996**, 258, 480.
- [21] Sato, S.; Fukuda, M.; Hagihara, M.; Tanabe, Y.; Ohkubo, K.; Morii, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 30.
- [22] Sassanfar, M.; Szostak, J. W. *Nature* **1993**, 364, 550.
- [23] Cotner, E. S.; Smith, P. J. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 1737.
- [24] Mannironi, C.; Scerch, C.; Fruscoloni, P.; Tocchini-Valentini, G. P. *RNA*, **2000**, 6, 520.
- [25] Vianini, E.; Palumbo, M.; Gatto, B. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 2543.
- [26] Ellington, A. D.; Szostak, J. W. *Nature* **1990**, 346, 818.
- [27] Tuerk, C.; Gold, L. *Science* **1990**, 249, 505.

第三章

細胞内シグナル伝達経路に関わるタンパク質のチロシンリン酸化部位を検出する RNA-ペプチド複合体の創製

概要

第二章でリボヌクレオペプチド機能化法によりリン酸化チロシンを特異的に認識するリボヌクレオペプチドリセプターが構築できたことから、第三章ではタンパク質のリン酸化部位に局在するリン酸化チロシン残基とその周辺のアミノ酸配列を特異的に認識するリボヌクレオペプチドリセプターとリボヌクレオペプチドセンサーの作製を行った。リン酸化チロシンを含むテトラペプチドに対するリボヌクレオペプチドリセプターは、リン酸化チロシンとその周辺の特徴的なアミノ酸配列を高選択的に識別した。さらに、蛍光性リボヌクレオペプチドセンサーの作製法を適用することによって、リセプターが有する基質選択性や親和性が保持された蛍光性バイオセンサーへの機能改変に成功した。リボヌクレオペプチドリセプター・センサー構築方法論は、リン酸化チロシンを含むペプチドに対する人工リセプターや蛍光性バイオセンサーの作製法として適用可能であることを示した。

3-1 緒言

高等動物細胞におけるシグナル伝達機構の研究が進展し、細胞内シグナル伝達の分子機構が明らかにされつつある[1]。タンパク質中のチロシン残基のリン酸化反応といったタンパク質翻訳後修飾反応は、細胞内シグナル伝達経路の制御に重要である[2, 3]。タンパク質中のチロシンリン酸化反応は、チロシンリン酸化酵素とチロシン脱リン酸化酵素の2種の酵素によって可逆的に制御され、シグナル伝達経路に関わるタンパク質-タンパク質相互作用様式に影響を与え、細胞の増殖・分化、ガン化、細胞死などの多様な細胞応答の制御に関与する[4]。

例えば、GSK3 (glycogen synthase kinase-3, グリコーゲン合成酵素をリン酸化する酵素) 中 216 番目チロシン残基(-Ser-pTyr-Ile-)のリン酸化と、Raf-1 (セリン・スレオニンリン酸化酵素) 中 340 番目チロシン

残基(-Ser-pTyr-Tyr-)のリン酸化は、インスリン受容体などにより活性化される PKB (protein kinase B, タンパク質リン酸化酵素) により制御されることが報告されている[5, 6]。GSK3 と Raf-1 は同じリン酸化酵素 PKB によりリン酸化をうけるが、チロシンリン酸化部位の C 端側のアミノ酸が、GSK3 の場合 Ile、Raf-1 の場合 Tyr というようにチロシンリン酸化部位の周辺のアミノ酸配列が異なる。このチロシンリン酸化部位の周辺の 1 アミノ酸が異なるタンパク質によって、グリコーゲンの合成もしくは細胞の増殖・分化という異なる細胞応答に対応するシグナル伝達経路が制御される。この観点から、標的とするリン酸化タンパク質の識別には、リン酸化チロシン残基だけでなく、その周辺のアミノ酸配列も特異的に認識する必要があると考えられる。リン酸化タンパク質を検出する一般的な方法として、放射標識法[7]や抗体[8]、マスペクトルメトリー[9-11]、人工センサー[12]を利用した方法が挙げられる。現在、これらの検出法により、細胞内シグナル伝達経路に関わるリン酸化タンパク質の動態が解析されている。

放射線標識法は、ATP のリン酸部位が放射線同位体で置換された ATP を基質として用い、タンパク質リン酸化反応後、放射線同位体でラベル化されたリン酸化タンパク質を放射線活性により検出する手法である[7]。基質 ATP を媒介としたリン酸化反応は、細胞内の複数のタンパク質をリン酸化することから、免疫沈降などを用いた標的リン酸化タンパク質を選別する操作が必要であり、放射線標識法単独では、標的とするリン酸化タンパク質だけを検出することは困難である。

マスペクトルメトリーを用いたリン酸化タンパク質の検出法[9-11]は、細胞抽出液から多数のリン酸化タンパク質を網羅的に検出する優れた方法であるが、測定分子のイオン化過程において問題点があり、定量性を求める手段としては信頼性に欠ける手法である。

2002 年浜地ら[12]によって開発された亜鉛錯体センサーは、リン酸化ペプチドのリン酸基と亜鉛錯体の錯形成を原理として、簡便かつ高感度にリン酸化ペプチドを検出する。しかし、リン酸基との錯形成の原理に基づいた亜鉛錯体センサーは、リン酸基を高選択的に検出するが、リン酸化されたアミノ酸残基の周辺のアミノ酸配列の識別は困難である。また、亜鉛錯体センサーは、生体反応で生成する ATP やピルビン酸などのリン酸イオンに阻害される可能性が高く、標的とするリン酸化タンパク質だけを検出するセンサーとして満足するものではない。

一方、リン酸化タンパク質を高感度に検出する抗体[8]は、標的とするリン酸化タンパク質中のチロシンリン酸化部位とその周辺のアミノ配列に対して高い選択性と親和性を有することから、非常に有用な人

エリセプターである。現在、哺乳類細胞内において約 600 ぐらいのチロシンリン酸化部位が同定されており、チロシンリン酸化タンパク質を特異的に検出する抗体が約 80 ぐらい市販されている[13, 14]。しかしながら、現在同定されているチロシンリン酸化部位に対して、その抗体が網羅されていない。この理由として、抗体作製には多大な時間と労力を必要とすることが挙げられる[15]。また、リン酸化タンパク質を定量する際に、酵素免疫測定法などの煩雑な操作を必要とする問題点も抱えている[16]。上記のことから、迅速かつ簡便に特定のリン酸化タンパク質を高感度に検出する方法論が望まれている。

リン酸化タンパク質を迅速かつ簡便に検出する有効な方法として、萩原ら[17]が開発したリボヌクレオペプチドセンサーの作製法が挙げられる。リボヌクレオペプチドセンサー構築方法論は、リン酸化タンパク質を定量する上で抗体を用いた場合とは異なり、煩雑な操作がなく、高感度なバイオセンサーが迅速に作製可能である。また、細胞内シグナル伝達経路におけるタンパク質リン酸化は、瞬時かつ可逆的に酵素タンパク質の高次構造を変化させるので、反応機構の解析にはタンパク質中のリン酸化部位を直接的に認識・制御するバイオセンサーが求められる。リボヌクレオペプチドセンサーは、リセプター分子の特性を保持することから、タンパク質中のリン酸化部位を直接的な認識・制御が可能なセンサーでもある。

第三章では、リボヌクレオペプチド機能化法を用いて、シグナル伝達に関わるリン酸化タンパク質中のリン酸化チロシンを含むテトラペプチドを捕捉するリボヌクレオペプチドリセプターの作製と、光学的にセンシングするリボヌクレオペプチドセンサーの開発を行った。

標的とするタンパク質リン酸化部位は、ガン遺伝子 Ras[18, 19]の活性化に関与する EBNA2 co-activator 中に(図3-1)含まれる 883 番目のチロシンリン酸化配列(Gly-pTyr-Ser-Arg, GpYSR)にした。アルギニンに対して、数十から数百 nM の平衡解離定数をもつ RNA アプタマー[20, 21]が作製されていることから、リボヌクレオペプチドリセプターの親和性の向上を図る為に、アルギニンを含む天然タンパク質のチロシンリン酸化部位を選択した。

標的タンパク質 EBNA2 co-activator は、ヒト細胞が Epstein Barr Virus という細胞を不死化させるウイルスに感染した際に、EBNA2 を核内に誘導させるホストタンパク質として知られている[18]。細胞内において EBNA2 co-activator は、タンパク質翻訳後修飾のリン酸化をうけることがマスマススペクトルメトリー[14]によって明らかにされたが、リン酸化タンパク質としての機能は未だ不明である。リン酸化タンパク

質を高選択的に識別できるリボヌクレオペプチドセンサーが開発できれば、EBNA2 co-activator に関するシグナル伝達経路を解明する為の分子ツールとしてだけでなく、任意のリン酸化タンパク質を迅速かつ高感度に検出する蛍光性バイオセンサーとして期待される。

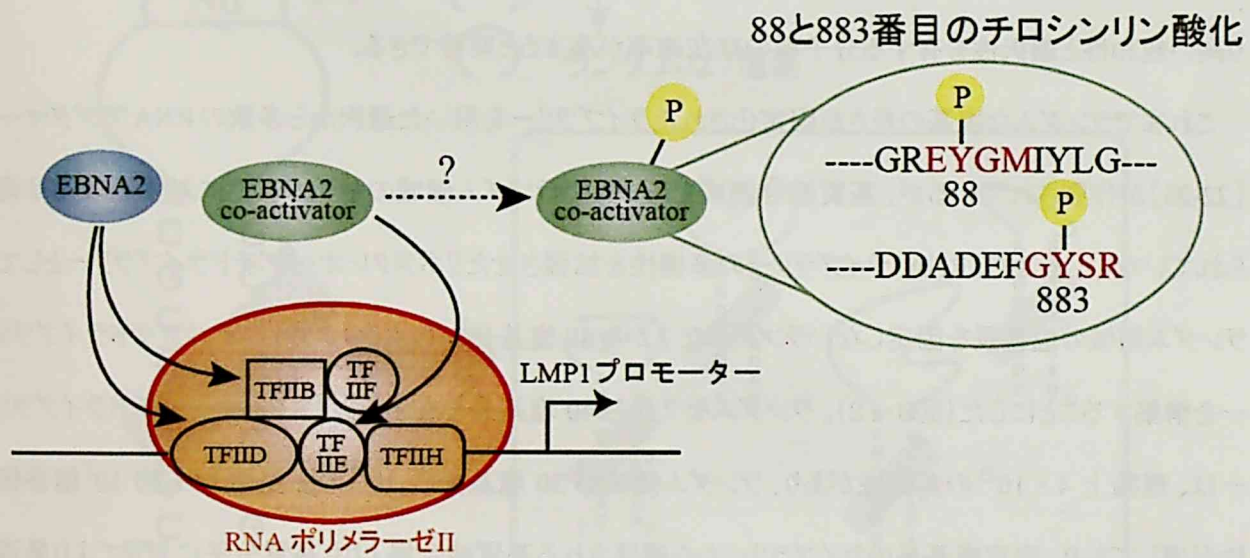


図3-1 ガン遺伝子 Ras の活性化に關与する EBNA2 co-activator の概略図

[EBNA2 co-activator は、ヒト細胞が Epstein Barr Virus という細胞を不死化させるウイルスに感染した際に、EBNA2 を核内に誘導させるタンパク質である。核内に移動した EBNA2 と EBNA2 co-activator は、RNA ポリメラーゼ II の基本転写因子 (TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH) との相互作用により LMP1 (転写因子 NFκB の制御) の発現制御に關与する。NFκB は、ガン遺伝子 Ras の制御因子として報告されている。]

3-2 結果と考察

3-2-1 ランダム領域の塩基長が異なるリボヌクレオペプチドライブラリーの構築

第二章におけるリン酸化チロシンを認識するリボヌクレオペプチドリセプターの作製において、ランダムな 30 塩基長の RNA ライブラリーを用いて得られたリボヌクレオペプチドリセプターの平衡解離定数が 376 μM であったことから、より高い親和性と選択性を有するリン酸化チロシンを含む GpYSR を認識するリボヌクレオペプチドリセプターを作製するために、ランダムな 30 塩基長の RNA ライブラリーより多様性が増したライブラリーを構築することにした。ライブラリーの多様性が増すことで基質分子に対して、より高い親和性と選択性を有する分子種の存在確率が高まると期待できる。

これまでランダムな塩基の長さが固定化されたライブラリーを用いた選択から多数の RNA アプタマー [22-25] が作製されているが、基質結合領域を形成するランダム領域の最適な長さに対する知見は得られていない。そこで、RNA ライブラリーの多様性を拡張させたリボヌクレオペプチドライブラリーとして、ランダム領域の塩基長を固定しないランダムな 7 から 40 塩基長を有するリボヌクレオペプチドライブラリーを構築することにした(図3-2)。ランダムな 7 から 40 塩基長を有するリボヌクレオペプチドライブラリーは、理論上 4×10^{23} の多様性があり、ランダム領域が 30 塩基長の 10^{18} の多様性よりも約 10^5 倍多様性が増しており、固定塩基長のライブラリーから構築される基質結合場よりも基質分子に対してより最適な結合場の構築が期待できる。

ランダムな 7 から 40 塩基長を有する DNA ライブラリーは、ランダムな 40 塩基を有する一本鎖 DNA とランダムな 7 塩基を有する一本鎖 DNA を用いて、Klenow 酵素による二本鎖 DNA への伸長反応によって作製した(図3-3)。Klenow 酵素の伸長反応では、ランダムな 40 塩基を有する一本鎖 DNA は、3'側がリン酸基末端になっていることから伸長反応は生じないが、ランダムな 7 塩基を有する一本鎖 DNA はランダムな 40 塩基の様々な位置でアニーリングが生じ、ランダム領域の塩基長が 7 から 40 塩基長の一本鎖 DNA ライブラリーが作製される。作製した一本鎖 DNA ライブラリーをもとに、PCR による増幅、転写反応による RNA への変換後、Rev ペプチドとの複合体形成により、ランダム領域に 7 から 40 塩基長を有するリボヌクレオペプチドライブラリーを構築した。

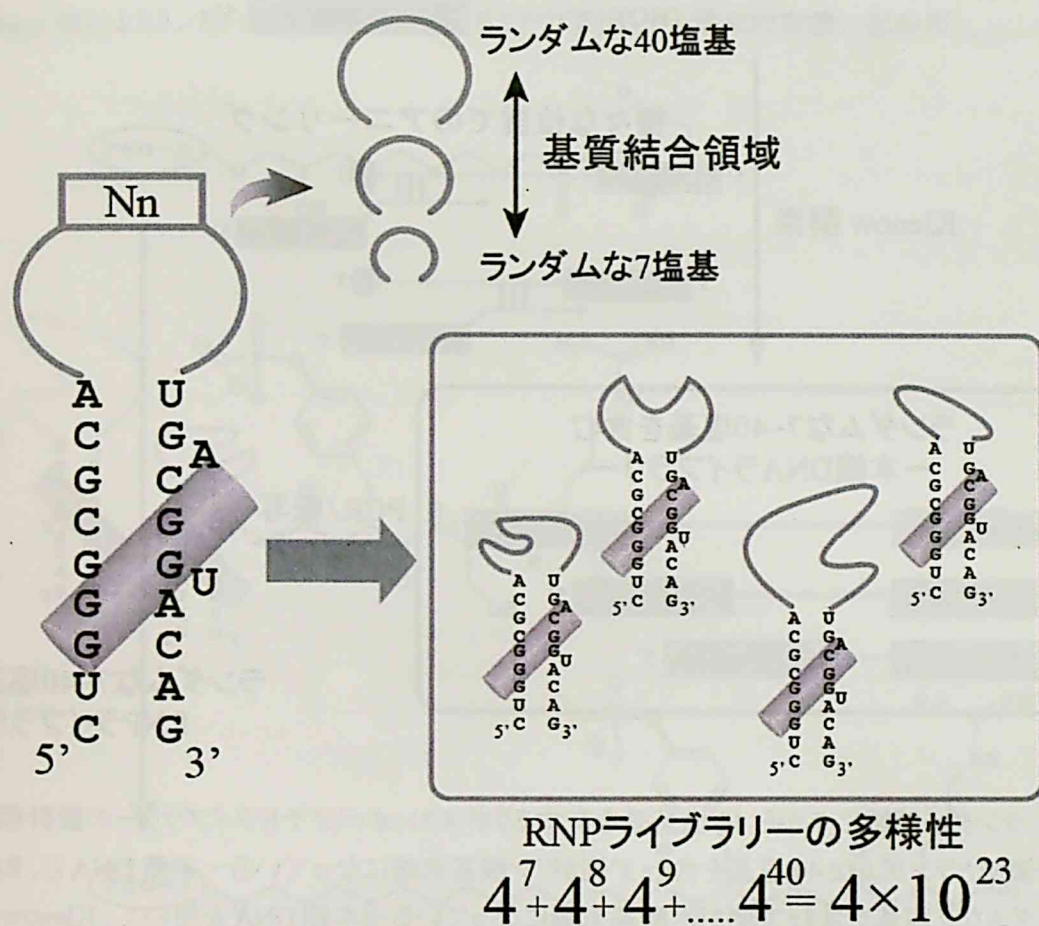


図3-2 基質結合領域にランダムな塩基が7から40塩基長を有する
リボヌクレオペプチドライブラリーの模式図

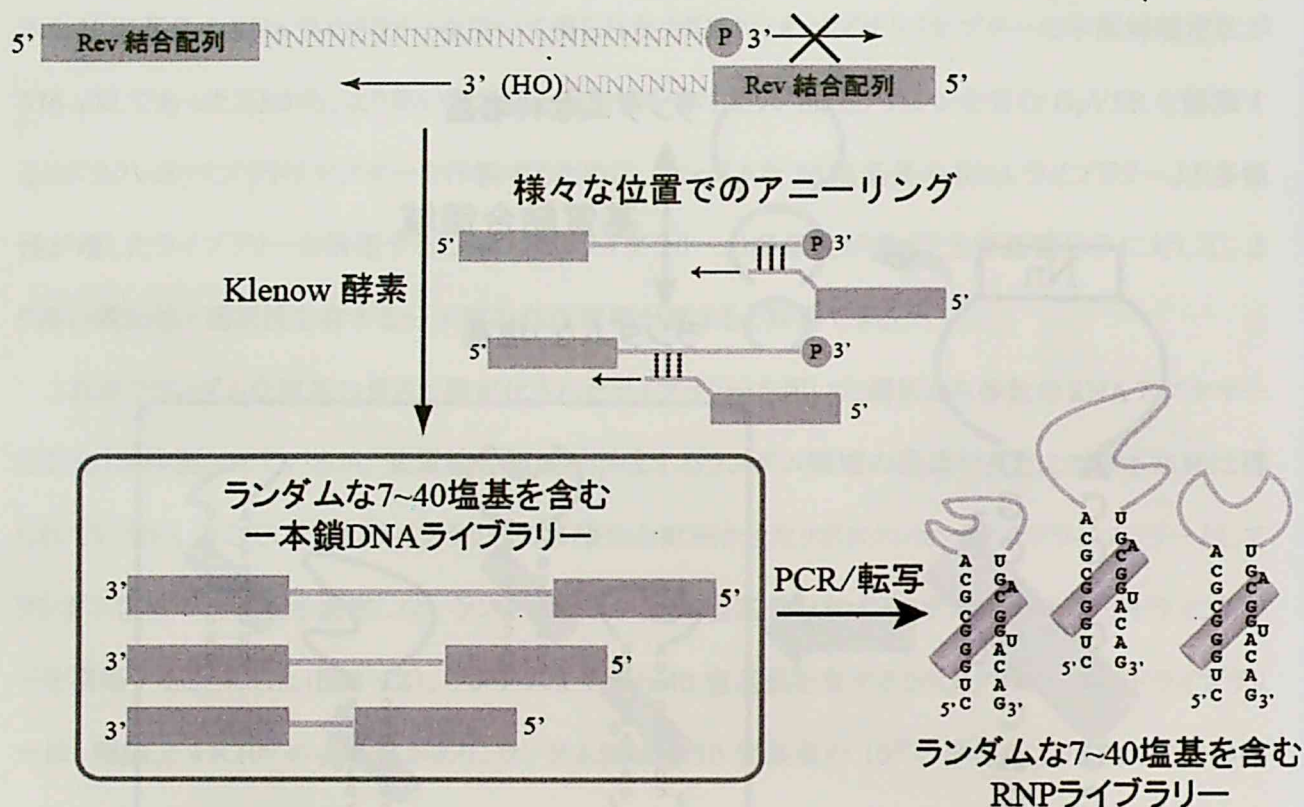


図3-3 ランダム領域に7から40塩基長を有するリボヌクレオペプチドライブラリーの設計戦略図
(Rev 結合領域とランダムな40塩基を含む3'側がリン酸基末端になっている一本鎖DNAと、Rev 結合領域とランダムな7塩基を含む3'側が水酸基末端になっている一本鎖DNAを用いて、Klenow 酵素により二本鎖DNAへの伸長反応を行う。伸長反応の過程で、ランダム領域の様々な位置でランダムな塩基同士のアニーリングが生じ、ランダム領域の塩基長が7から40塩基長の一本鎖DNAライブラリーを得ることができる。得られたライブラリーを基に増幅・転写によってRNAライブラリーに変換し、Rev ペプチドを添加することで、ランダム領域に7から40塩基長を有するリボヌクレオペプチドライブラリーが作製できる。)

3-2-2 GpYSR アガロース樹脂の作製

選択の過程で使用した GpYSR を固定化した樹脂は化学合成により作製した(図3-4)。スクシンイミドを有するアガロース樹脂と GpYSR を反応させることで、ペプチド結合によりアガロース樹脂に GpYSR が固定化した樹脂を作製した。未反応のスクシンイミドエステルは、エタノールアミンと反応させることでアガロース樹脂の末端部位を水酸基にした。作製した GpYSR アガロース樹脂の GpYSR 固定化濃度は、Briggs 法によりリン酸イオン濃度を見積もることで算出した(章末の実験の部参照)。

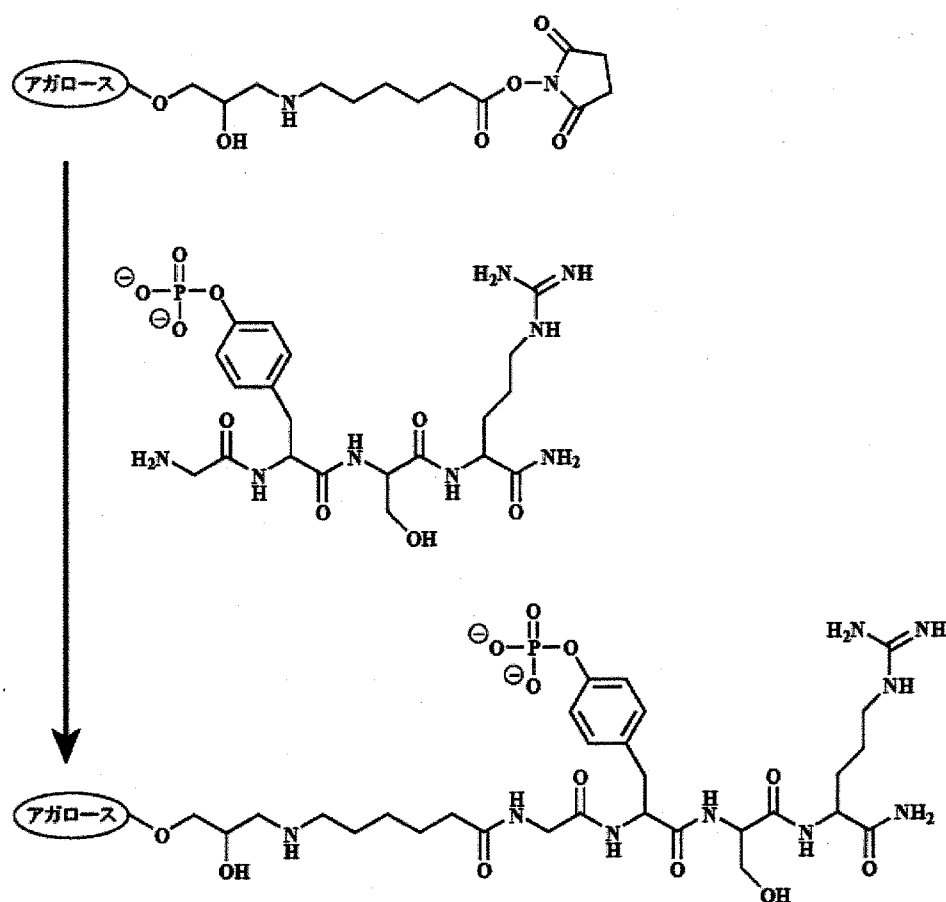


図3-4 GpYSR アガロース樹脂の化学構造

3-2-3 ネガティブ選択法を用いた GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドの選択

ランダムな 7 から 40 塩基長を有するリボヌクレオペプチドライブラリーを用いて、GpYSR アガロース樹脂に対して選択を行った。GpYSR に対する選択過程の 1 ラウンド目と 2 ラウンド目は、GpYSR アガロース樹脂に対して結合させたが、3 ラウンド目から 7 ラウンド目までは、先に GpY アガロース樹脂に対し

てリボヌクレオペプチドライブラリーを結合させて、その素通り面分を GpYSR アガロース樹脂に結合させた。先に GpY アガロース樹脂をとおすことによって、Gly-pTyr 部位だけを認識するリボヌクレオペプチドを意図的に排除し、Ser-Arg 部位に対して積極的に認識するリセプターを選択することで、よりリン酸化チロシンの周辺のアミノ酸配列に対して選択性が高まった分子種が獲得できると考えられる。

リボヌクレオペプチドライブラリーを GpYSR アガロース樹脂に結合させた後は、樹脂を十分に洗浄することで非特異的に結合しているリボヌクレオペプチドを除去した。洗浄後に GpYSR アガロース樹脂に結合しているリボヌクレオペプチドは、GpYSR により特異的な溶出を行った。溶出された RNA は、逆転写酵素により DNA に変換し、PCR により増幅した。この逆転写反応、PCR の過程で、GpYSR 結合活性が高められた DNA ライブラリーが作製される。増幅された DNA ライブラリーを転写し、新たに作製した RNA ライブラリーは、選択する前の RNA ライブラリーに比べ、GpYSR に対して結合活性が高まった分子種が濃縮されていると考えられる。このようにして、選択、増幅のサイクルを繰り返す行うことで、GpYSR に対して高い親和性を有するリボヌクレオペプチドを選択した。

7回の選択、増幅を繰り返した RNA ライブラリーにおいて、GpYSR 結合活性が 70 %まで上昇した(図 3-5)ことから、リボヌクレオペプチドの *in vitro* セレクション法が有効に機能していることが示唆されたため、RNA の配列解析を行った(図 3-6)。

配列解析した結果、GpYSR01 と GpYSR02 の 16 塩基長から GpYSR27 の 35 塩基長までの塩基長が異なる 27 クローンの RNA 配列が確認できた。ランダムな塩基の長さが固定化されたライブラリーが、基質結合場の構築に最適であると仮定すると、特定の塩基長のクローンが選択されてくると推察されるが、塩基長の異なる RNA クローンが選択されてきた結果より、固定塩基長のライブラリーでは獲得できなかった高い親和性や選択性を有する分子種が選択されてきた可能性を示す結果が得られた。

また、10 塩基の高度に保存された配列 5'-GUAUCAG---GAG-3'を有する 12 クローンが認められた。この保存配列は、リン酸化チロシンに対して選択された保存配列とは異なっていた。さらに、リン酸化チロシンに対して選択された pY03, pY09 RNA 配列と同様に、GpYSR17 の RNA 配列が 2 クローンと GpYSR14 の RNA 配列が 8 クローンの同一配列も確認できた。GpYSR に対して選択されたリボヌクレオペプチドは、リン酸化チロシンだけでなく、リン酸化チロシンを含む周辺のアミノ酸配列も認識する結合場を有する可能性が示唆できた。

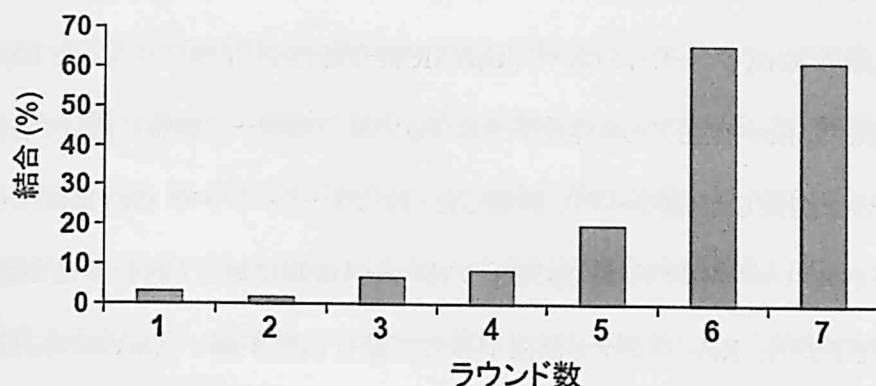


図3-5 各ラウンドにおける GpYSR アガロース樹脂に対する
リボヌクレオペプチドライブラリーの結合割合

(GpYSR アガロース樹脂に加える前のリボヌクレオペプチドの吸光度と GpYSR アガロース樹脂に加えた後の素通り画分の吸光度を測定して、非結合画分の結合割合を求めることによって、GpYSR アガロース樹脂に対するリボヌクレオペプチドの結合割合を算出した。)

GpYSR17 : UAAAACGCGGGGCUAGUCCUAUUGGUUACGAAUA (2)

GpYSR14 : AAACAGCCGCGCCAUAAAAUUGACAA (8)

GpYSR27 :	AAAGUUUACUUUGG	GUAUCAG	AUCGCGA	GAG	AAAG
GpYSR07 :		GUAUCAG	CCCGG	GAG	AAGCGUCACGUUGGUU
GpYSR33 :	UACAAC	GUAUCAG	CGCGU	GAG	AAUUGCG
GpYSR03 :		GUAUCAG	AUCAU	GAG	AAGCG
GpYSR30 :	UG	GUAUCAG	CGCACGA	GAG	G
GpYSR01 :		GAAUCAG	UUCGC	GAG	G
GpYSR02 :		GAAUCAG	GUCGU	GAG	G
GpYSR26 :	CAUUUG	GUAGAAG	CUCGGUU	GAG	AAGCG
GpYSR34 :	GAA	GUUAUAG	UUCGGUA	GAG	UCA
GpYSR15 :	AU	GAAUAAG	AUUCUGCGG	UAG	GUU
GpYSR04 :	UCC	GUUAUAG	ACCGC	UAG	AAGAUGCGUUCGCCG
GpYSR21 :	UUUUUAC	GUUAUAG	CGCGC	UAG	AAUAUUGA

GpYSR23 : UAGAUAGCAGUAUGACUUUAUCUCCAAGCU
 GpYSR28 : UUCGACGUACUAUUAUCGGUCCUCACACUGAGC
 GpYSR25 : GAUCGGACGUGGUCGUUCGGGGGAGAGCUUAAG
 GpYSR31 : GGCGAACCGGUUCGAGGAGUGCUUAAU
 GpYSR05 : CGUGCCGACUCCCGAGU

図3-6 7回の選択後における RNA サブユニットに 7 から 40 塩基長の
ランダム領域を有するリボヌクレオペプチドライブラリーの RNA 配列
(括弧内に示す数字は同じ配列をもつコロニー数、太字で示すのは保存配列)

3-2-4 GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドの特性

選択された 19 種類の RNA クローンについて、GpYSR 結合活性を ^{32}P ラベル化した RNA を用いた結合試験により評価した。Rev 存在下と非存在下での GpYSR アガロース樹脂に対して各リボヌクレオペプチドの結合割合を測定した(図3-7)。評価した 19 クローンの中で GpYSR07、GpYSR26、GpYSR25 以外のリボヌクレオペプチドは、GpYSR アガロース樹脂に対して結合活性が認められた。Rev ペプチド非存在下よりも Rev ペプチド存在下の方が結合活性が高い GpYSR17、GpYSR02、GpYSR 15 の 3 クローンが認められた。また、ペプチド存在下の方が結合活性が高い GpYSR17 と GpYSR02 と GpYSR 15 は、Rev ペプチド存在下・非存在下に関わらず GpYSR 結合活性がほとんど変わらないクローンとは異なる三者間の相互作用様式を有することが示唆された。一方、GpYSR25、GpYSR31 クローンのように Rev ペプチド存在下よりも RNA 単独の方が結合活性が高いクローンも認められた。選択されたリセプターの詳しい結合様式は不明ではあるが、ペプチド存在下・非存在下に関わらずリボヌクレオペプチドリセプターの作製法によって、GpYSR に対する結合場が作製可能であることを示した。

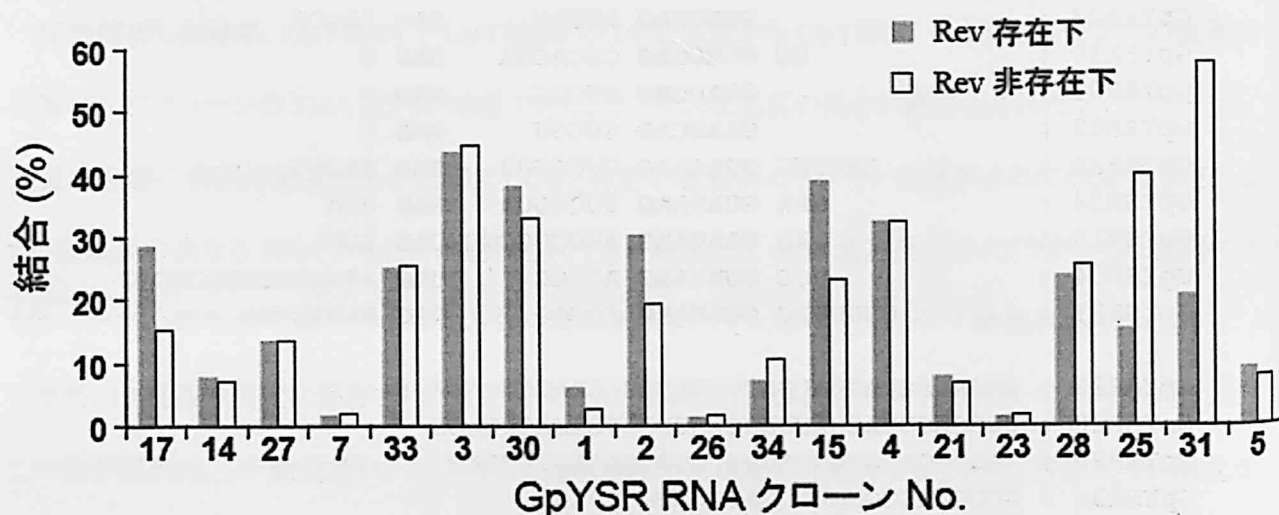


図3-7 GpYSR アガロース樹脂に対する各 RNA クローンの
Rev 存在下・非存在下における結合割合

[黒色の縦棒は Rev 存在下での結合(%)を示し、白色の縦棒は Rev 非存在下での結合(%)を示す。]

3-2-5 GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドリセプターの親和性評価

リボヌクレオペプチドと GpYSR との複合体の親和性評価は、 ^{32}P ラベル化された RNA と Rev ペプチドを用いて、GpYSR アガロース樹脂に対する結合試験を行うことで評価した。評価したクローンは、Rev ペプチド非存在下よりも Rev ペプチド存在下の方が結合活性が高い GpYSR17 と GpYSR 15 について検討した。GpYSR17 あるいは GpYSR 15 を Rev ペプチドと複合体を形成させ、GpYSR アガロース樹脂の濃度を変化させることで、GpYSR アガロース樹脂に対して結合したリボヌクレオペプチドの結合割合を測定することで平衡解離定数を求めた。 ^{32}P ラベル化されたリボヌクレオペプチドを GpYSR アガロース樹脂に加え、結合バッファーで結合しないリボヌクレオペプチドを洗浄することで GpYSR に対して非特異的な結合するリボヌクレオペプチドを除去した。洗浄後、結合バッファー中に含まれる GpYSR を用いた特異的な溶出により、GpYSR アガロース樹脂に結合したリボヌクレオペプチドの割合を見積もった。GpYSR アガロース樹脂の各々の濃度における特異的に溶出されたリボヌクレオペプチドの結合割合は、GpYSR 濃度増加に伴った結合飽和曲線で与えられた(図3-8)。GpYSR17、GpYSR 15 の各 RNA と Rev からなるリボヌクレオペプチドの GpYSR に対する平衡解離定数は、理論式の非線形最小二乗回帰から算出した(章末の実験の部参照)。10塩基の高度な保存配列 5'-GUAUCAG---GAG-3' を有する GpYSR15/Rev 複合体の平衡解離定数は $K_d = 73 \pm 6 \mu\text{M}$ であり、同一配列が 2 クローン認められた GpYSR17/Rev 複合体の平衡解離定数は、 $K_d = 186 \pm 14 \mu\text{M}$ であった。リン酸化チロシンに対して選択されたクローンの中で最も親和性が高かった pY03/Rev 複合体の平衡解離定数が $376 \mu\text{M}$ よりも、GpYSR に対して選択されたリボヌクレオペプチドの方が親和性が高かった。選択の過程において GpY だけを認識するクローンを排除するという選択圧は、Ser-Arg 部位への選択性を高める選択圧であるが、選択されたリボヌクレオペプチドリセプターがアルギニン部位を積極的に認識することによって、静電相互作用の寄与により親和性が向上した可能性が考えられる。

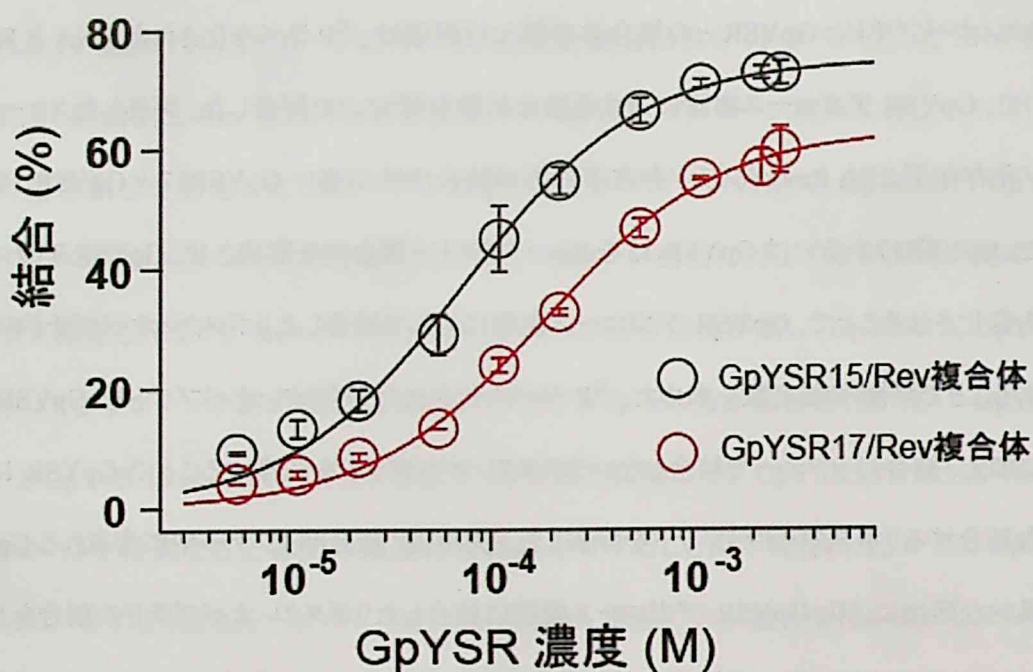


図3-8 リボヌクレオペプチドリセプターの GpYSR に対する結合親和性評価
(各 GpYSR 濃度における GpYSR15/Rev 複合体(黒丸)と
GpYSR17/Rev 複合体(赤丸)の結合割合を示す。)

3-2-6 GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドリセプターの選択性

リボヌクレオペプチドリセプターの GpYSR 認識様式を調べるために、GpYSR と構造的に類似した分子(図3-9)を用いて競合試験により選択性を評価した。競合試験に使用した競合物質は、Fmoc ペプチド固相合成法に従って作製し、¹H-NMR と Mass スペクトルにより同定した(章末の実験の部参照)。合成した競合物質は、リン酸化チロシン部位の変異体である GYSR と GpSSR、Gly 部位の変異体 LpYSR、Ser 部位の変異体 GpYAR、Arg 部位の変異体 GpYSA の五種類のテトラペプチドである。GpYSR15/Rev 複合体と GpYSR17/Rev 複合体について五種類の GpYSR 変異体テトラペプチドを用いて競合試験を行った。

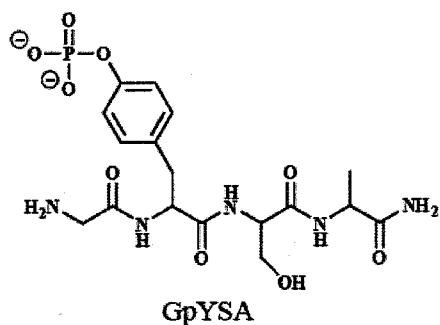
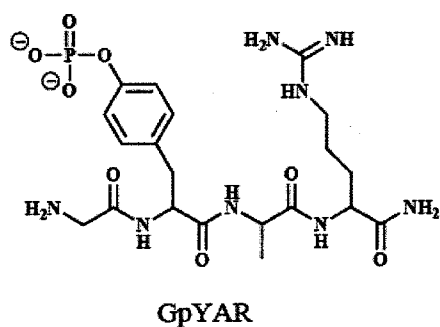
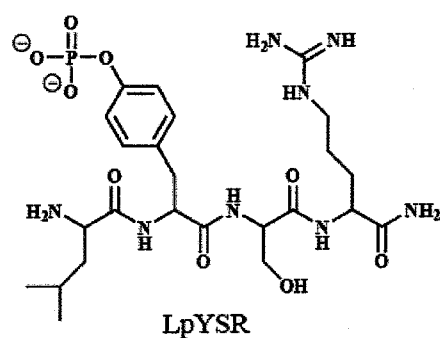
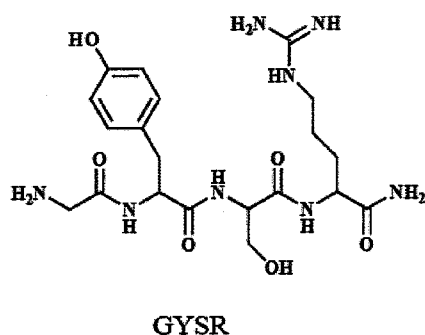
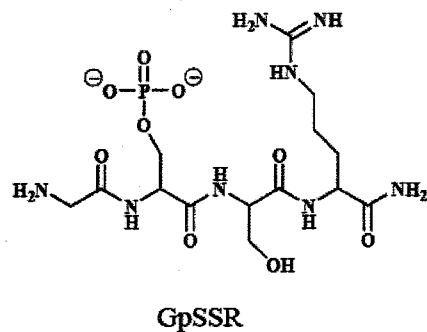
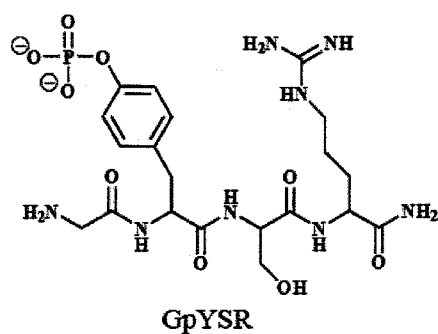


図3-9 競合試験に使用したリン酸化チロシンを含むテトラペプチドの化学構造

GpYSR15/Rev 複合体の競合試験の結果(図3-10)、リン酸化チロシン部位の誘導体である GYSR とGpSSR については、競合物質が1 mM 存在下でも特異的な結合阻害が認められなかった。この結果より、ランダム領域の塩基長が異なるライブラリーを用いたリボヌクレオペプチド機能化法により、リン酸チロシン部位の芳香環とリン酸基の部位を高選択的に識別するリセプターが作製できることを示した。しかし、Gly 部位の変異体 LpYSR、Ser 部位の変異体 GpYAR、Arg 部位の変異体 GpYSA については、特異的な結合阻害が認められ、リン酸チロシン部位の周辺のアミノ酸部位は、リン酸チロシン部位

ほどリセプターの識別には関与していないことが明らかになった。Gly 部位の変異体 LpYSR に対するリボヌクレオペプチドリセプターの平衡解離定数は $K_d = 171 \mu\text{M}$ で、GpYSR と比較すると 2.3 倍の親和性の差が認められ、N 末端部位も弱いながらも認識に関与していた。一方、Ser 部位の変異体 GpYAR に対するリボヌクレオペプチドリセプターの平衡解離定数は $K_d = 96 \mu\text{M}$ で、Arg 部位の変異体 GpYSA に対するリボヌクレオペプチドリセプターの平衡解離定数は $K_d = 80 \mu\text{M}$ であったことから、セリンの水酸基とアルギニンのグアニジノ基は、リボヌクレオペプチドと GpYSR の三者間の複合体形成においてほとんど寄与しないことが明らかになった。

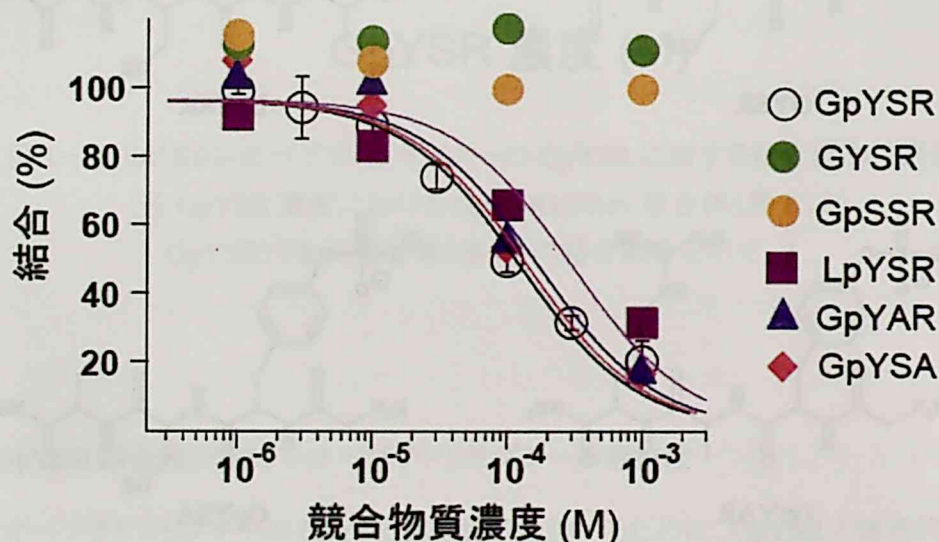


図3-10 GpYSR15/Rev 複合体の競合試験結果

[各リガンド濃度共存下における GpYSR15/Rev 複合体の GpYSR アガロース樹脂に対する結合割合: 各リガンド濃度のデータポイントは、GpYSR (白丸)、GYSR (緑丸)、GpSSR (橙丸)、LpYSR (紫四角)、GpYAR (青三角)、GpYSA (桃ダイヤ) で示す。]

GpYSR17/Rev 複合体の競合試験から得られた選択性 (図3-11) は、GpYSR15/Rev 複合体の選択性とは異なった。リン酸化チロシン部位の誘導体である GpSSR と Arg 部位の変異体 GpYSA に対して、競合物質が 1 mM 存在下でも特異的な結合阻害が認められなかった。リン酸チロシン部位の芳香環と Arg 部位のグアニジノ基がリボヌクレオペプチドと GpYSR の三者間の複合体形成に寄与することが示

唆できる結果であり、GpYSR15/Rev 複合体の選択性とは異なり、リン酸化チロシン部位以外のアルギニン残基を認識していた。さらに、リン酸化チロシン部位の誘導体である GYSR に対するリボヌクレオペプチドリセプターの平衡解離定数は $K_d = 645 \mu\text{M}$ で GpYSR と比較すると 3.4 倍の親和性の差が認められ、リン酸基に対しても選択的なリセプターであることを示すとともに、Gly 部位の変異体 LpYSR に対するリボヌクレオペプチドリセプターの平衡解離定数は $K_d = 1.0 \text{ mM}$ で、5.3 倍の親和性の差があることにより、リン酸化チロシンの N 末端部位も分子認識に寄与することがわかった。しかしながら、Ser 部位の変異体 GpYAR に対するリボヌクレオペプチドリセプターの平衡解離定数は $K_d = 91 \mu\text{M}$ であったことから、セリンの水酸基部位は分子認識に全く関与しないことが示された。GpYSR17/Rev 複合体の GpYSR 結合様式は、pTyr 部位、Arg 部位が積極的にリボヌクレオペプチドリセプターとの相互作用に関与することが明らかになった。

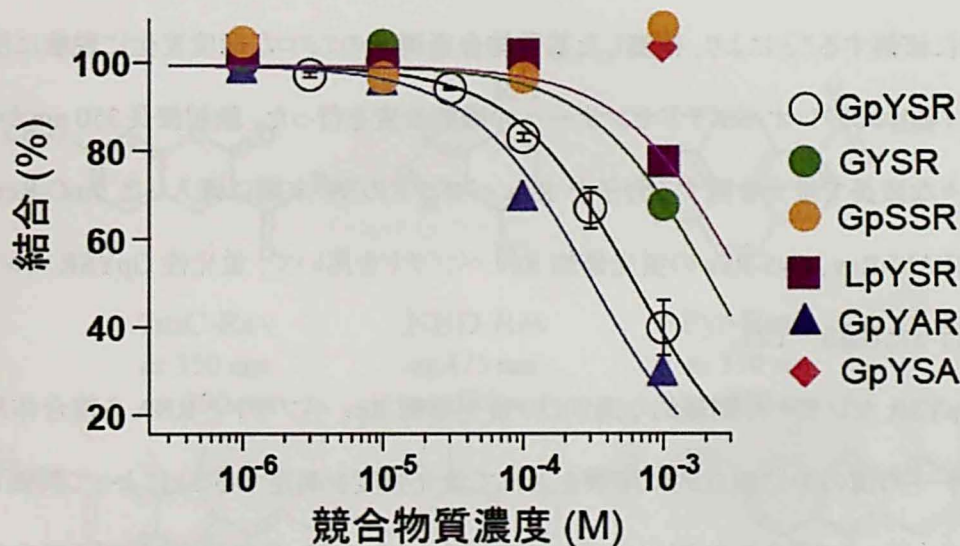


図3-11 GpYSR17/Rev 複合体の競合試験結果

[各リガンド濃度共存下における GpYSR17/Rev 複合体の GpYSR アガロース樹脂に対する結合割合: 各リガンド濃度のデータポイントは、GpYSR(白丸)、GYSR(緑丸)、GpSSR(橙丸)、LpYSR(紫四角)、GpYAR(青三角)、GpYSA(桃ダイヤ)で示す。]

GpYSR15/Rev 複合体と GpYSR17/Rev 複体のリボヌクレオペプチドリセプターは、リン酸化チロシン残基だけでなく、周辺のアミノ酸残基も識別可能であることを示した。しかし、GpY に結合する分子種を排除する選択圧は、GpYSR15/Rev 複体の選択性で示されたように C 端側のアルギニン部位やセリン部位が分子認識にほとんど関与しないリセプターが選択された。このことは、GpY に結合する分子種を排除する選択圧が十分に機能していなかったことが考えられるが、GpYSR17/Rev 複合体が C 端側のアルギニン部位に対して積極的な分子認識に関与することが示唆されたことにより、GpY に結合する分子種を排除する選択法は、選択性を高める選択圧として有効に機能することが示唆できた。

3-2-7 GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドセンサーの選別

リボヌクレオペプチド機能化法により GpYSR に対して特異的に結合するリボヌクレオペプチドリセプターの作製に成功した。次に、微少な環境変化に対して感受性の高い蛍光色素をペプチドサブユニットの N 末端に修飾することにより、構築した基質結合場周囲のミクロな環境変化に鋭敏に反応し、蛍光変化を誘起するリボヌクレオペプチドセンサーへの機能改変を行った。励起波長 350 nm から 650 nm までの間で様々な波長で蛍光を発する分子を Rev ペプチドの N 末端に導入した 7mC-Rev、Pyr-Rev、NBD-Rev、5FAM-Rev、Cy5-Rev の蛍光修飾 Rev ペプチドを用いて、蛍光性 GpYSR センサーの網羅的な選別を行った(図3-12)。

蛍光性 GpYSR センサーの網羅的な選別は、蛍光修飾 Rev ペプチドと RNA を複合体形成させて、96 穴のプレートの溝の中に独立的に溶液を入れて蛍光強度を測定することによって評価した。使用した RNA は、3-2-3 で得られた RNA を用いた。0.5 mM GpYSR 存在下・非存在下での蛍光性リボヌクレオペプチドの蛍光強度をマイクロプレートリーダーを用いて測定した。蛍光性リボヌクレオペプチドと GpYSR 存在下での蛍光強度 (I)、蛍光性リボヌクレオペプチドと GpYSR 非存在下での蛍光強度 (I_0) とした相対的蛍光強度 (I/I_0) を、7mC-Rev と Pyr-Rev は 390 nm の発光波長で測定し、5FAM-Rev は 535 nm、Cy5 は 670 nm で検出した。

7mC-Rev を用いた場合、GpYSR17 と GpYSR01 と GpYSR02 と GpYSR 15 の RNA は、クマリン分子の周辺環境の微妙な変化に応答して蛍光強度変化の上昇が認められた(図3-13)。5FAM-Rev の

場合、GpYSR14 と GpYSR26 と GpYSR15 のように蛍光強度変化の上昇が観測できたが、GpYSR25 は下降を示した(図3-14)。Pyr-Rev の場合、GpYSR15 が蛍光強度変化の上昇、GpYSR28 と GpYSR31 が下降を示した(図3-15)。また、NBD-Rev を用いた場合は、GpYSR17 と GpYSR01 と GpYSR15 が蛍光強度変化の上昇を示した(図3-16)。さらに、Cy5-Rev を用いた場合は、GpYSR25 と GpYSR31 が顕著な蛍光強度変化の減少が認められた(図3-17)。

これらの結果は、ATP に対するリボヌクレオペプチドセンサー[17]の時と同様に、GpYSR RNA クローンと蛍光修飾 Rev ペプチドライブラリーから蛍光センサーを網羅的に選別することができた。しかし、ATP RNA クローンを有するセンサーは、最大 7 倍の相対蛍光強度変化を示したが、今回選択された GpYSR RNA クローンを有するセンサーは、最大 2 倍の相対蛍光強度変化であったことから、ATP センサーと同様に感度の高い GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドセンサーが構築できなかった。

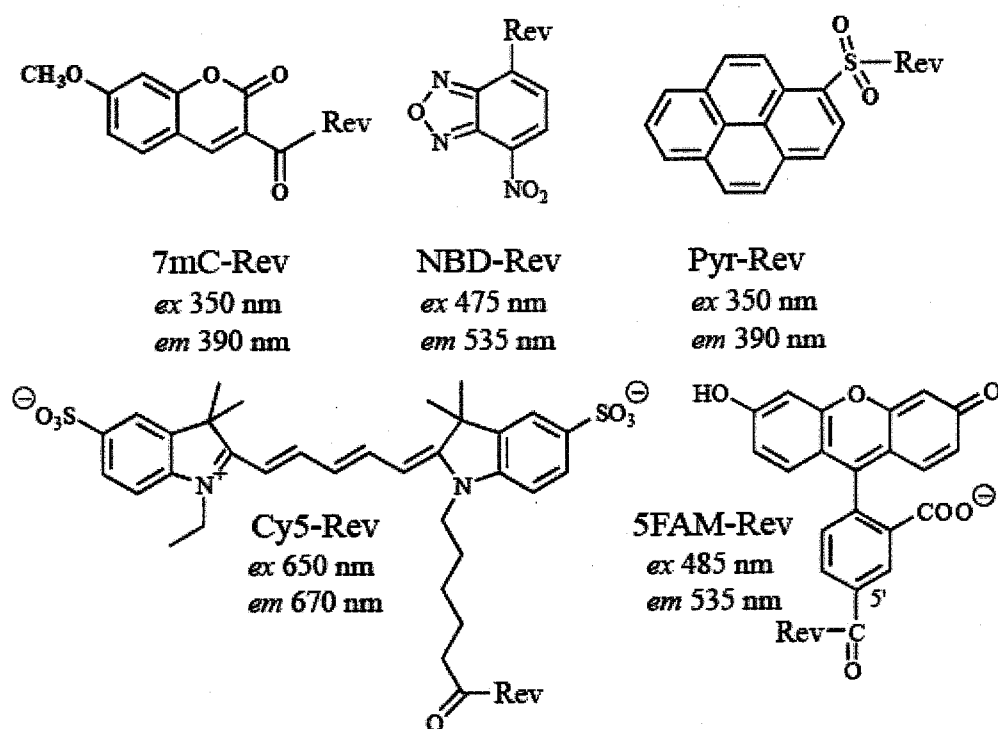


図3-12 本研究で使用した蛍光修飾 Rev ペプチドの化学構造

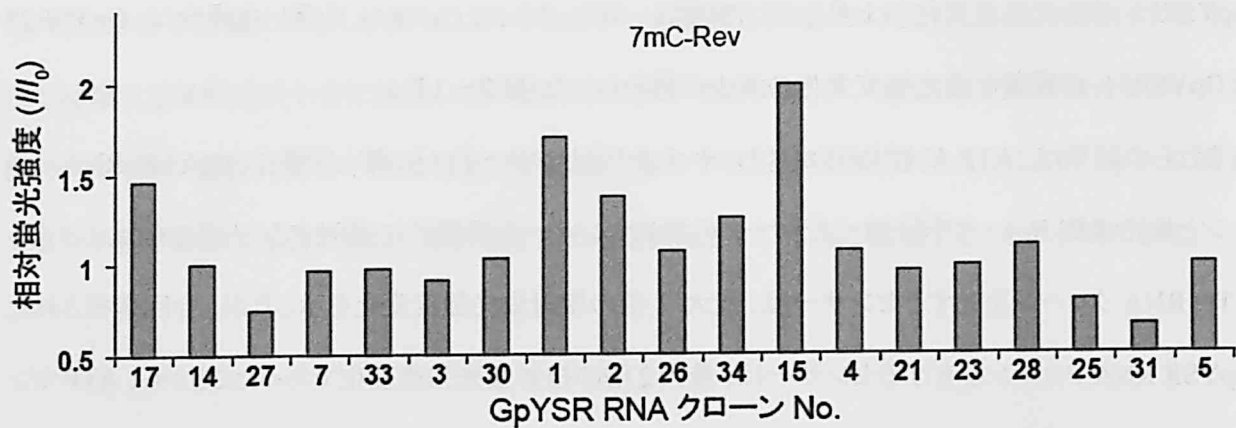


図3-13 0.5 mM GpYSR 存在下での 7mC-Rev と各 GpYSR RNA クローン複合体の
相対蛍光強度の比較

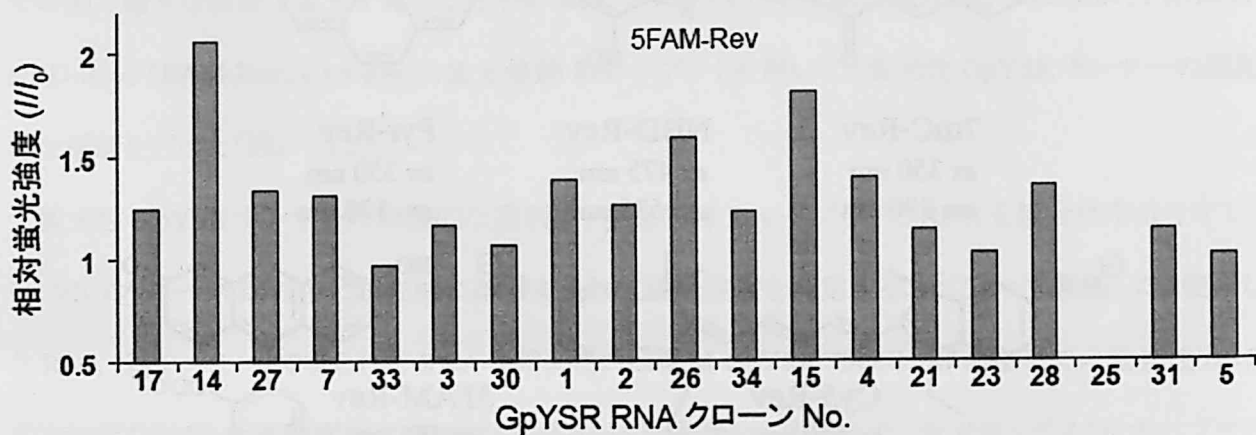


図3-14 0.5 mM GpYSR 存在下での FAM-Rev 誘導体と各 GpYSR RNA クローン複合体の
相対蛍光強度の比較

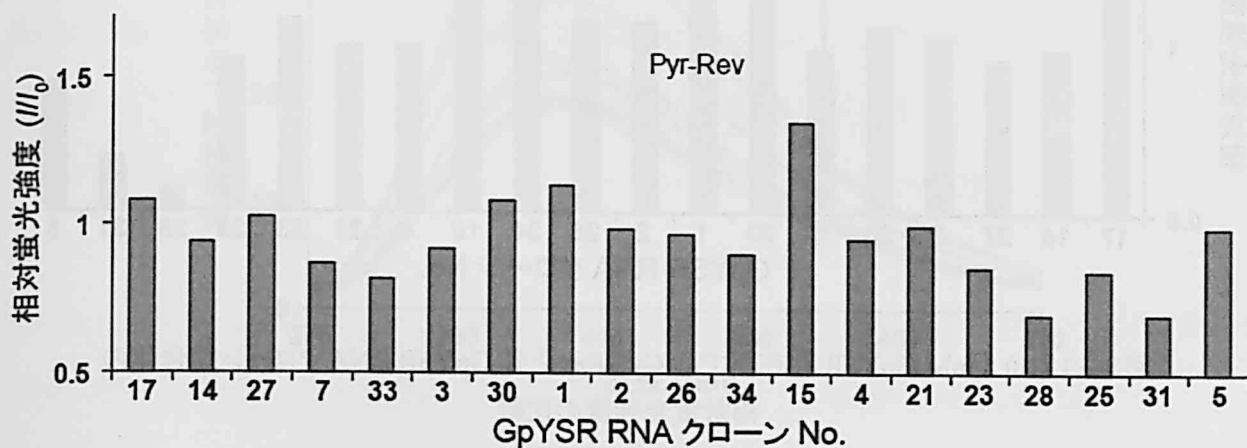


図3-15 0.5 mM GpYSR 存在下での Pyr-Rev と各 GpYSR RNA クローン複合体の
相対蛍光強度の比較

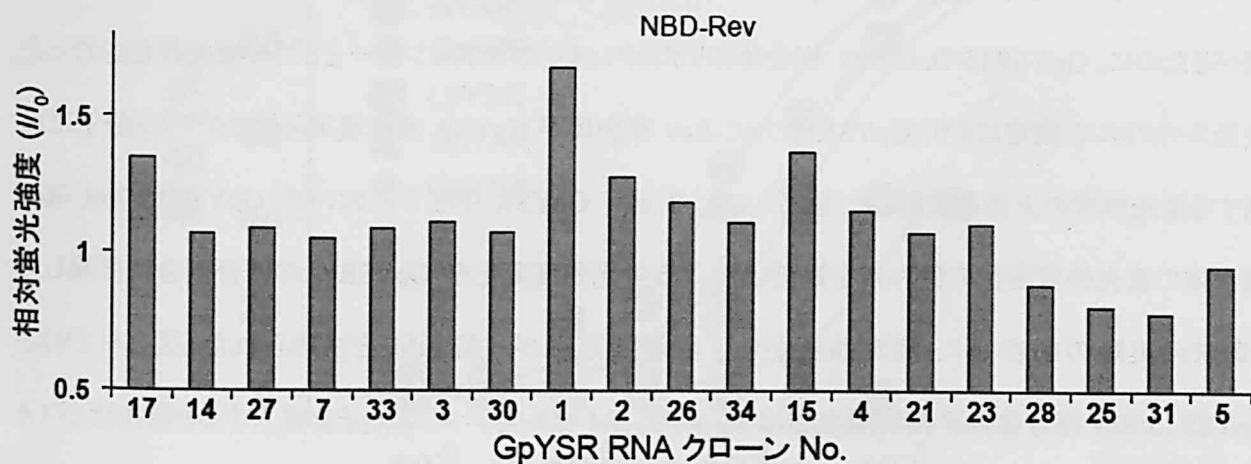


図3-16 0.5 mM GpYSR 存在下での NBD-Rev と各 GpYSR RNA クローン複合体の
相対蛍光強度の比較

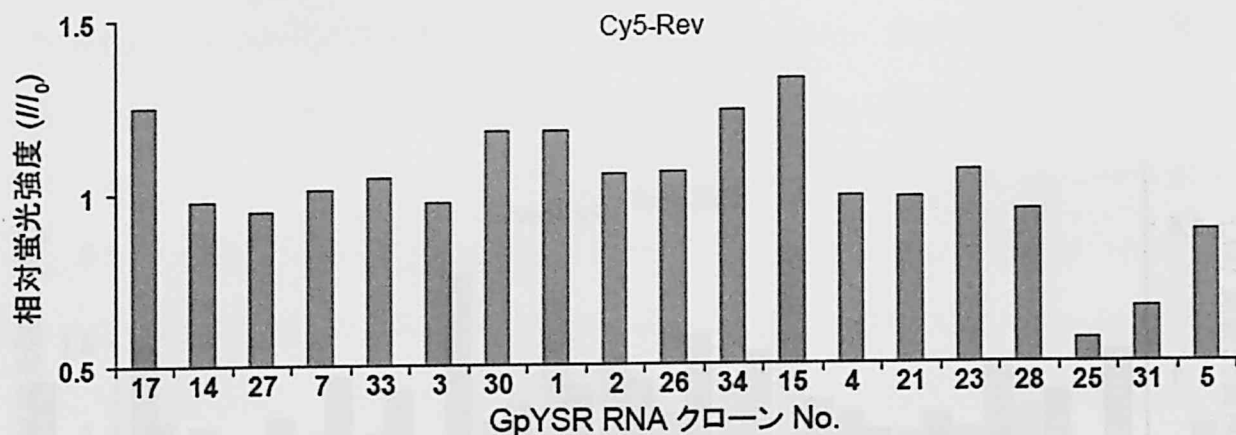


図3-17 0.5 mM GpYSR 存在下での Cy5-Rev と各 GpYSR RNA クローン複合体の相対蛍光強度の比較

3-2-8 GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドセンサーの機能評価

蛍光修飾 Rev ペプチドを用いた網羅的な蛍光センサーの選別の結果、蛍光分子の種類によって、GpYSR 結合時に蛍光特性が異なる多数のリボヌクレオペプチドセンサーが得られた。次に、Rev ペプチド N 末端に蛍光分子を導入しても、リセプターと同じ基質選択性と親和性を保持しているかどうかを調べるために、GpYSR15/7mC-Rev 複合体のリボヌクレオペプチドセンサーとしての機能評価を行った。蛍光スペクトルの測定により、GpYSR15/7mC-Rev 複合体が GpYSR 濃度増加と共にクマリン分子に由来する蛍光強度の上昇を観測した(図3-18)。2 mM GpYSR 存在下において、GpYSR15/7mC-Rev 複合体の蛍光強度変化の飽和点を観測した。この蛍光強度変化を GpYSR との結合割合に変換して(章末の実験の部参照)、滴定曲線から平衡解離定数が 102 μM と求められた(図3-19)。GpYSR15/Rev 複合体の平衡解離定数は $K_d = 73 \mu\text{M}$ であり、クマリン分子を導入すると親和性が 1.4 倍低下した。ペプチドサブユニットに蛍光分子が導入されたことにより、蛍光分子が RNA サブユニットの基質結合領域での GpYSR との相互作用を阻害し、GpYSR とリボヌクレオペプチドの三者間の複合体形成の安定性が低下したと考えられる。

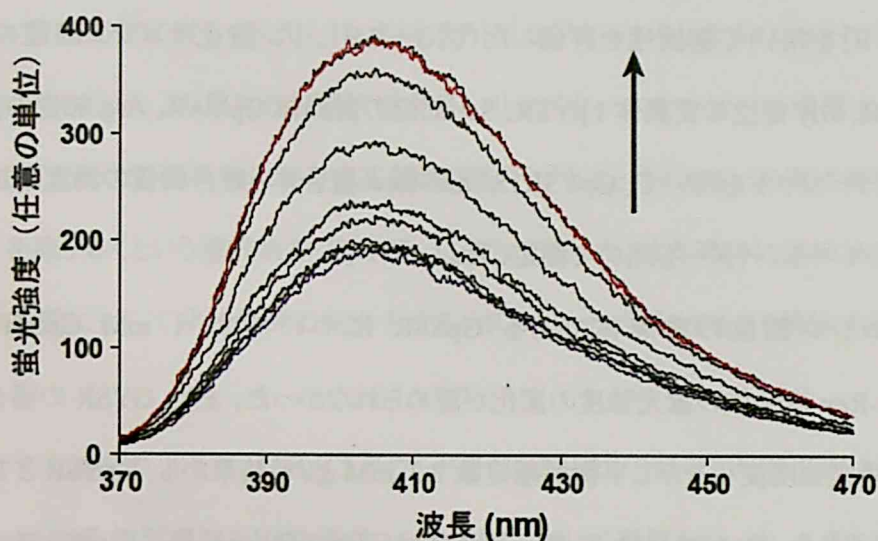


図3-18 GpYSR15/7mC-Rev 複合体の GpYSR 依存的な蛍光強度

[励起波長 355 nm で励起した GpYSR15/7mC-Rev 複合体の蛍光スペクトル。矢印は、各 GpYSR 濃度 (0, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 2000 μ M) 増加による蛍光変化の方向を示す。赤線は GpYSR が非存在下での GpYSR15/7mC-Rev 複合体のスペクトルを示し、青線は GpYSR 濃度が 2000 μ M 存在下での GpYSR15/7mC-Rev 複合体のスペクトルを示す。]

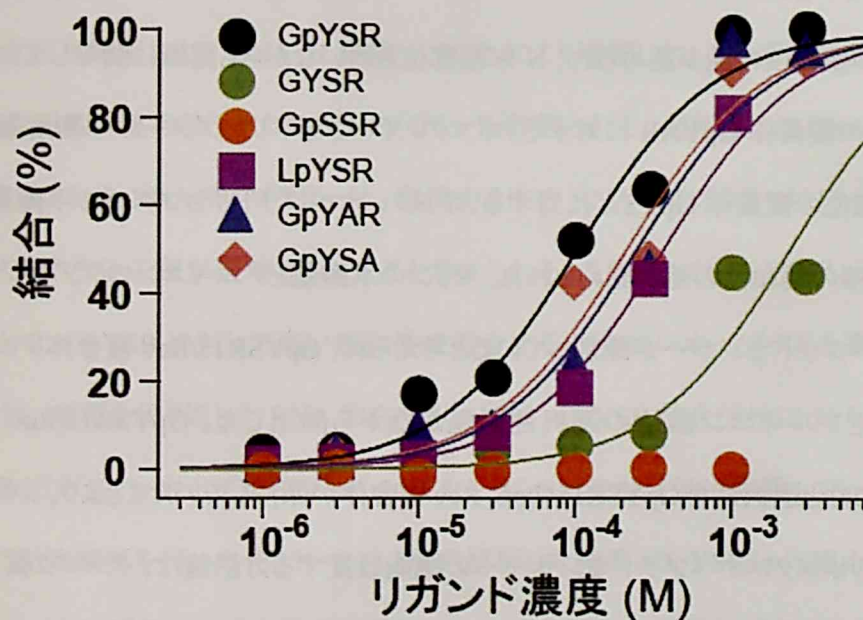


図3-19 GpYSR15/7mC-Rev 複合体の GpYSR 滴定曲線

[GpYSR15/7mC-Rev 複合体の各リガンド濃度共存下における蛍光変化量を結合割合にしてプロットした。各リガンド濃度のデータポイントは、GpYSR (黒丸)、GYSR (緑丸)、GpSSR (橙丸)、LpYSR (紫四角)、GpYAR (青三角)、GpYSA (桃ダイヤ) で示す。]

次に、リボヌクレオペプチドセンサーの GpYSR 認識様式を調べるために、GpYSR と構造的に類似した分子 (図 3-9) を用いて選択性を評価した (図 3-19)。リン酸化チロシン部位の変異体である GYSR と GpSSR、Gly 部位の変異体 LpYSR、Ser 部位の変異体 GpYAR、Arg 部位の変異体 GpYSA の五種類のテトラペプチドを用いて、GpYSR15/7mC-Rev 複合体と競合物質の濃度増加に伴った蛍光強度をマイクロプレートリーダーを用いて測定した。

リン酸化チロシン部位の誘導体である GpSSR については、1 mM GpSSR 存在下でも GpYSR15/7mC-Rev 複合体の蛍光強度の変化が認められなかった。また、GYSR の場合、GYSR の濃度上昇とともに蛍光強度変化を示し平衡解離定数 2.3 mM という結果から、GpYSR と 1 オーダーの親和性の差が認められた。GpYSR15/7mC-Rev 複合体は、リセプターと同様にリン酸化チロシン部位の芳香環とリン酸基の部位を高選択的に識別するセンサーであることが明らかになった。

次に、Gly 部位の変異体 LpYSR、Ser 部位の変異体 GpYAR、Arg 部位の変異体 GpYSA について調べた結果、どの競合物質においても蛍光強度変化が観測でき、リン酸チロシン部位の周辺のアミノ酸部位はリン酸チロシン部位ほどセンサーの識別には関与していないことが明らかになった。Gly 部位の変異体 LpYSR に対するリボヌクレオペプチドセンサーの平衡解離定数は $K_d = 364 \mu\text{M}$ で、GpYSR と比較すると約 3 倍の親和性の差が認められ、N 末端部位も弱いながらも認識に関与していると考えられる。一方、Ser 部位の変異体 GpYAR に対するリボヌクレオペプチドリセプターの平衡解離定数は $K_d = 246 \mu\text{M}$ で、Arg 部位の変異体 GpYSA に対するリボヌクレオペプチドリセプターの平衡解離定数は $K_d = 212 \mu\text{M}$ で約 2 倍の親和性の差が認められた。セリンの水酸基とアルギニンのグアニジノ基も弱いながらもリボヌクレオペプチドセンサーが識別していると考えられ、GpYSR15/Rev 複合体リセプターと比較するとセリン部位とアルギニン部位の選択性が僅かながら向上した。GpYSR15/Rev 複合体の GpYSR に対する親和性と選択性を GpYSR15/7mC-Rev 複合体が保持していたことより、リボヌクレオペプチドリセプターからリボヌクレオペプチドセンサーへの機能改変する方法論は、タンパク質中のチロシンリン酸化部位に対する蛍光性センサーの作製法として適用可能であることを示した。

3-2-9 基質濃度を段階的に下げた選択法による GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドの選択

タンパク質リン酸化部位に対してリボヌクレオペプチドリセプターからリボヌクレオペプチドセンサーへの機能改変に成功したが、より親和性と選択性が高いリセプターやセンサーを構築するために更なる選択方法の改良を行った。選択時における基質濃度を下げることによって、基質に対して結合親和性が低いクローンを取り除くという選択法を GpYSR に対して行った。また同時に選択後の洗浄条件を厳しくすることで、基質に対して非特異的に結合をするリボヌクレオペプチドをより排除するという操作も併せて行った。

GpYSR に対する選択の 1 ラウンド目と 2 ラウンド目は、3-2-3 で示した選択方法と同様の方法で基質濃度 3.2 mM の条件下で、GpYSR アガロース樹脂に対して選択を行った。3 ラウンド目から 9 ラウンド目までは、基質濃度 0.1 μ M まで下げて、GpYSR アガロース樹脂に対して選択を行った。樹脂の洗浄操作は、1 ラウンド目と 2 ラウンド目とは結合バッファーを加えてから、すぐに結合バッファーを遠心により取り除いたが、3 ラウンド目から 9 ラウンド目までは結合バッファーを加えてから 5 分静置後、遠心により結合バッファーを取り除くことで、非特異的に結合しているリボヌクレオペプチドを除去した。GpYSR アガロース樹脂に結合したリボヌクレオペプチドは、GpYSR により特異的に溶出させた。溶出された RNA は、逆転写酵素により DNA に変換し、PCR により増幅した。この逆転写反応、PCR の過程で、GpYSR 結合活性が高められた DNA ライブラリーが作製される。増幅された DNA ライブラリーを転写し、新たに構築された RNA ライブラリーは、選択する前の RNA ライブラリーに比べ、GpYSR に対してより結合能を有する分子種が濃縮されていると考えられる。このようにして、選択、増幅のサイクルを繰り返し行うことで、GpYSR に対して高い親和性で結合するリボヌクレオペプチドを選択した。

9 回の選択、増幅を繰り返した RNA ライブラリーでは、GpYSR 結合活性は 50 % まで上昇した (図 3-20) ことから、リボヌクレオペプチドの *in vitro* セレクション法が有効に機能していることが示唆されたため、RNA の配列解析を行った (図 3-21)。配列解析した結果、GpYSR34 に認められた 18 塩基長から GpYSR20 の 37 塩基長までの塩基長が異なる 6 クローンの RNA 配列が選択された。また 8 塩基の高度に保存された配列 5'-AUCAG---GAG-3' を有する 5 クローンが認められた。5'-AUCAG---GAG-3' を有する配列は、3-2-2 で選択された配列と同じ保存配列をもつことから、GpYSR に対する親和性と選択性が同程度に有することが示唆できる結果であった。さらに、GpYSR20 にみられる 18 クローンのう

ち10クローンが同一配列であるクローンと、GpYSR19にみられる18クローンのうち4クローンが同一配列であるクローンが確認できた。今回得られたクローンの中で5'-AUCAG---GAG-3'の保存配列を有するクローンと3-2-2で選択された配列を比較したところ、同じ配列を有するクローンは確認できなかった。このことから、段階的に基質濃度を下げた選択法によって得られたリセプターは、3-2-2で選択されたリセプターよりも GpYSR に対する親和性が高いリセプターである可能性を示した。

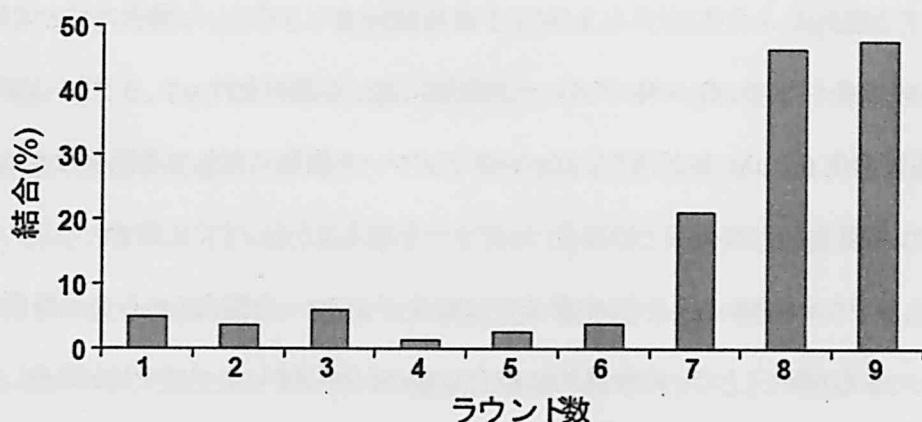


図3-20 各ラウンドにおける GpYSR アガロース樹脂に対する
リボヌクレオペプチドライブラリーの結合割合

(GpYSR アガロース樹脂に加える前のリボヌクレオペプチドの吸光度と GpYSR アガロース樹脂に加えた後の素通り画分の吸光度を測定して、非結合画分の結合割合を求めることによって、GpYSR アガロース樹脂に対するリボヌクレオペプチドの結合割合を算出した。)

GpYSR20 :	UACUUAAGUCGCGCGU	AUCAG	AUCAC	GAG	AACGCAAC (10)
GpYSR19 :	UGCGA	AUCAG	UUCGG	GAG	GACAUG CGAG AAUUGU (4)
GpYSR33 :	AUGA	AUCAG	AGCGC	GAG	GGU
GpYSR34 :	CGA	AUCAG	AUCGC	GAG	GA
GpYSR35 :	UA	AACAG	AGCU	GCG	CAUUAUUACACA
GpYSR36 :	AUGCCGCCAGUUUGUCACGA				

図3-21 9回の選択後における RNA サブユニットに7から40塩基長の
ランダム領域を有するリボヌクレオペプチドライブラリーの RNA 配列
(括弧内に示す数字は同じ配列をもつコロニー数、太字で示すのは保存配列)

3-2-10 GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドの特性

選択された6種類のRNAクローンの中から複数の同一配列が得られたGpYSR20とGpYSR19と保存配列5'-AUCAG---GAG-3'のうち二塩基が異なるGpYSR35について、GpYSR 結合活性を ^{32}P ラベルしたRNAを用いて結合試験により評価した。Rev 存在下・非存在下でのGpYSR アガロース樹脂に対するリボヌクレオペプチドの結合割合を測定した(図3-22)。評価した3クローンともRev ペプチド存在下・非存在下に関わらずGpYSR 結合活性がほとんど変わらなかった。3クローンの中で結合活性が一番高かったGpYSR20について、詳細な検討を行った。

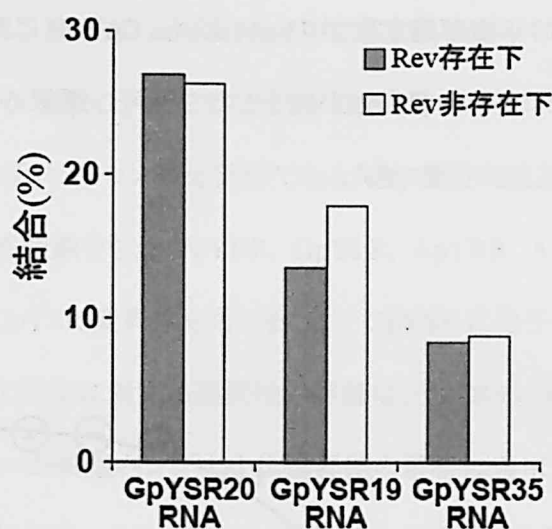


図3-22 GpYSR アガロース樹脂に対する各 RNA クローンの
Rev 存在下・非存在下における結合割合

[黒色の縦棒は Rev 存在下での結合(%)を示し、白色の縦棒は Rev 非存在下での結合(%)を示す。]

3-2-11 GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドリセプターの親和性評価

リボヌクレオペプチドとGpYSRとの複合体の結合安定性は、 ^{32}P ラベル化されたRNAとRev ペプチドとGpYSR アガロース樹脂に対する結合試験を行うことで評価した。GpYSR 20をRev ペプチドと複合体を形成させ、固定化されたGpYSR アガロース樹脂の濃度を変化させることで、GpYSR アガロース樹脂に対して結合したリボヌクレオペプチドの結合割合を測定した。 ^{32}P ラベル化されたリボヌクレオペ

チドを GpYSR アガロース樹脂に加え、結合バッファーで結合しないリボヌクレオペプチドを洗浄することで GpYSR に対して非特異的な結合するリボヌクレオペプチドを除去した。洗浄後に、結合バッファー中に含まれる GpYSR を用いた特異的な溶出により、GpYSR アガロース樹脂に結合したリボヌクレオペプチドの割合を求めた。GpYSR アガロース樹脂の各々の濃度における特異的に溶出されたリボヌクレオペプチドの結合割合を算出することで、GpYSR に対する結合飽和曲線が与えられた(図3-23)。

GpYSR20 と Rev からなるリボヌクレオペプチドの GpYSR に対する平衡解離定数は、理論式の非線形最小二乗回帰から算出した(章末の実験の部参照)。8 塩基の高度な保存配列 5'-AUCAG---GAG-3'を有するを有する GpYSR20/Rev 複合体の GpYSR に対する平衡解離定数は、 $K_d = 4.8 \pm 0.6 \mu\text{M}$ であった。GpYSR15/Rev 複体の平衡解離定数が $73 \mu\text{M}$ よりも、GpYSR に対して平衡解離定数が 1 オーダー向上した。選択されたクローンの親和性が向上したことから、選択の過程において基質濃度を下げた選択圧が有効に機能することが示唆できた。

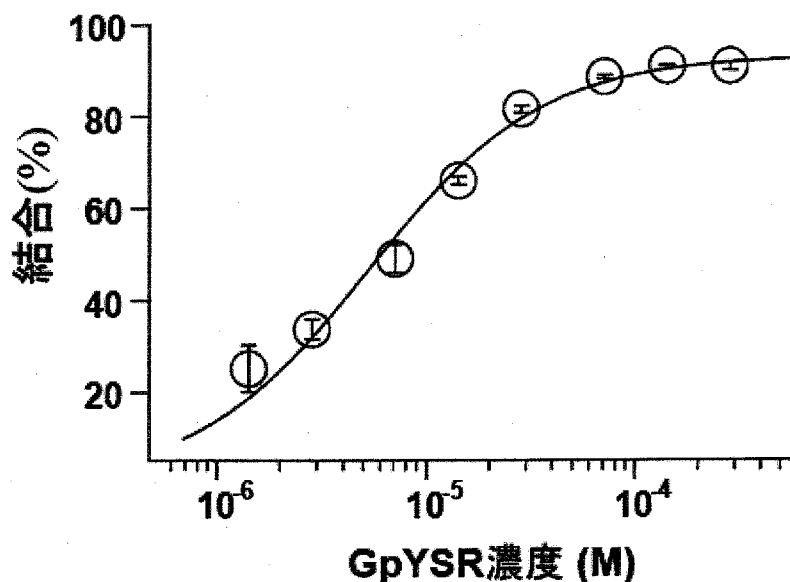
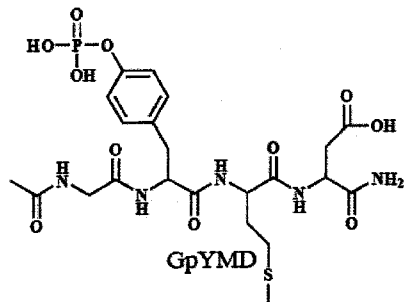
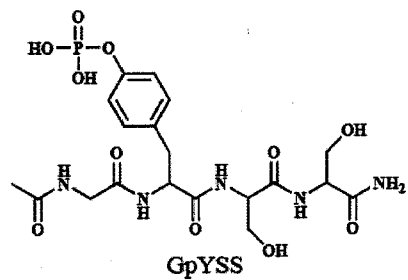
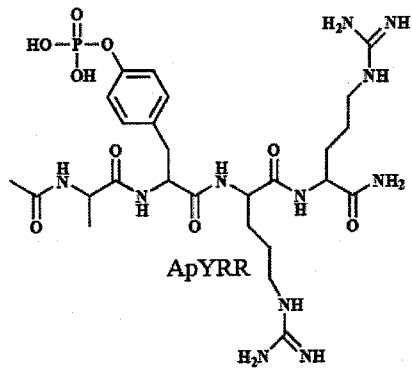
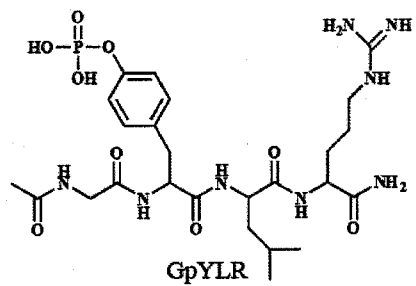
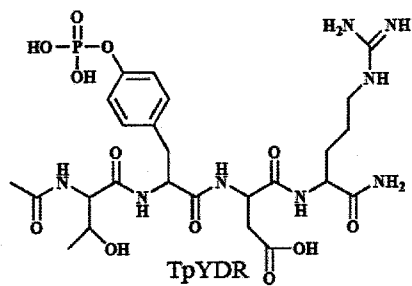
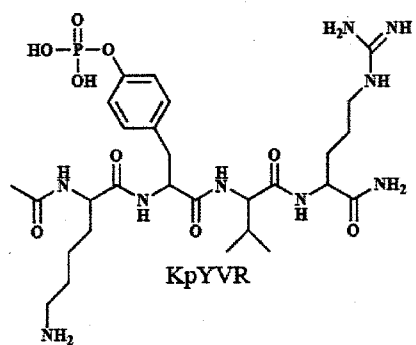
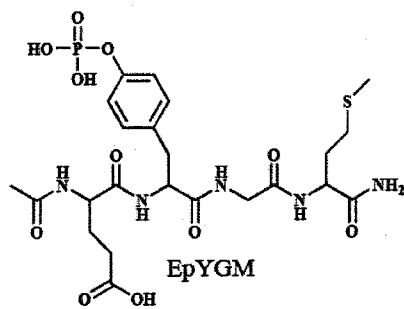
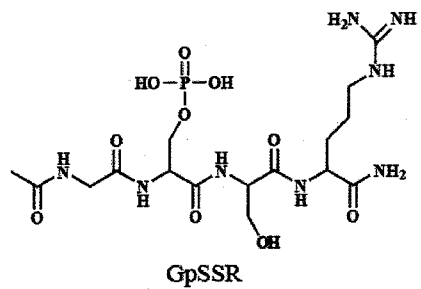
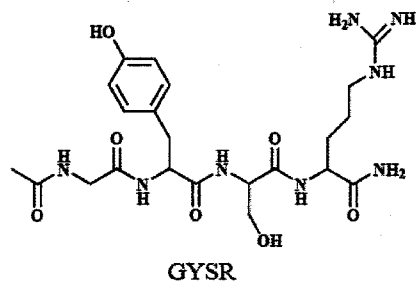


図3-23 リボヌクレオペプチドリセプターの GpYSR に対する結合親和性評価
(各 GpYSR 濃度における GpYSR20/Rev 複合体(黒丸)との結合割合を示す。)

3-2-12 GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドリセプターの選択性

リボヌクレオペプチドリセプターの GpYSR 認識様式を調べるために、GpYSR と構造的に類似した天然タンパク質中のチロシンリン酸化部位のテトラペプチドを用いて競合試験により選択性を評価した。競合試験に用いた競合物質 (図3-24) は、Fmoc ペプチド固相合成法に従って作製し、¹H-NMR と Mass スペクトルにより同定した (章末の実験の部参照)。リン酸化チロシン部位の変異体である GYSR と、GpSSR と、7 種類の天然タンパク質中のチロシンリン酸化部位のテトラペプチドを、競合試験に用いる競合物質として使用した。7 種類の天然のタンパク質中チロシンリン酸化部位のテトラペプチドは、EpYGM、KpYVR[26]、TpYDR[27]、GpYLR[28]、ApYRR[29]、GpYMD[30]、GpYSS[31]である。EpYGM は GpYSR と同じ EBNA2 co-activator 中に含まれるタンパク質中のチロシンリン酸化部位 (図3-1) であるが、残りの 6 種類のテトラペプチドは GpYSR のチロシンリン酸化部位をもつタンパク質とは異なるタンパク質中のチロシンリン酸化部位である。Gly 部位に塩基性側鎖をもつ KpYVR、Ser 部位に酸性、疎水性、塩基性側鎖をもつ TpYDR、GpYLR、ApYRR、Arg 部位に酸性、極性側鎖をもつ GpYMD、GpYSS の各 GpYSR 変異体を用いることで GpYSR に分子認識様式が明らかになる。天然タンパク質チロシンリン酸化部位に対する選択性の評価は、リボヌクレオペプチドリセプターあるいはリボヌクレオペプチドセンサーが細胞内シグナル伝達経路の解析に適用可能であるかどうか検討できる。

GpYSR20/Rev 複合体を用いてチロシンリン酸化部位の選択性を評価した (図3-25)。競合試験からリン酸化チロシン部位の誘導体である GYSR と GpSSR の競合物質が 1 μ M から 100 μ M 存在下において、特異的な結合阻害が認められなかった。GpYSR20/Rev 複合体は、リン酸化チロシン部位の芳香環とリン酸基の部位を高選択的に識別していることが示された。さらに、GpYSR と同じ EBNA2 co-activator 中に含まれるタンパク質中のチロシンリン酸化部位 EpYGM に対する GpYSR20/Rev 複体の平衡解離定数は $K_d = 128 \mu\text{M}$ で、GpYSR に対する平衡解離定数 $K_d = 4.8 \mu\text{M}$ であったことより、約 26 倍の親和性の差が認められた (図3-26 (A))。



60

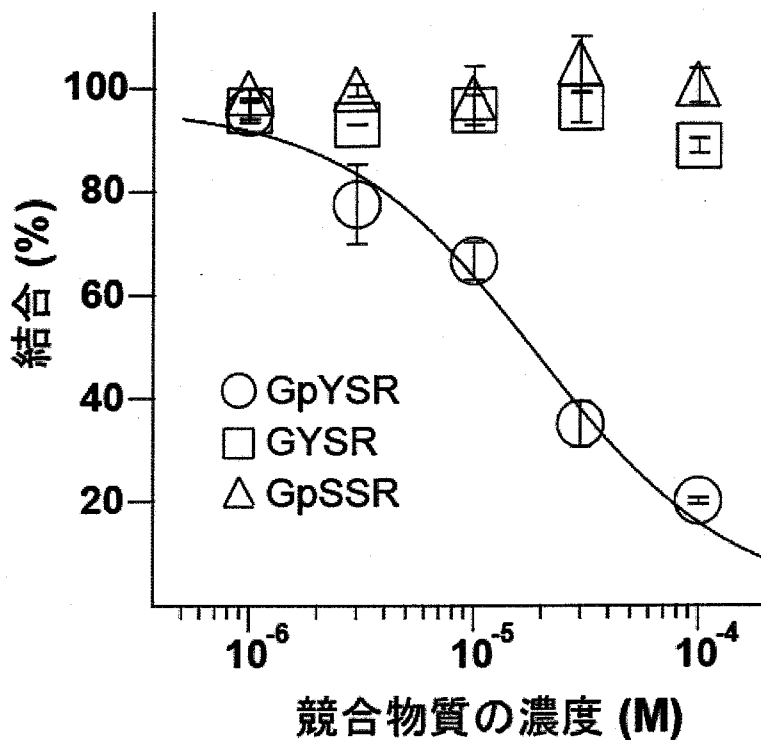


図3-25 GpYSR20/Rev 複合体の競合試験結果

[各リガンド濃度共存下における GpYSR20/Rev 複合体の GpYSR アガロース樹脂に対する結合割合：各リガンド濃度のデータポイントは、GpYSR(丸)、GYSR(四角)、GpSSR(三角)で示す。]

次に、異なるタンパク質中のチロシンリン酸化部位に対する GpYSR20/Rev 複体の平衡解離定数は、Gly 部位に塩基性側鎖をもつ KpYVR の場合 $K_d = 106 \mu\text{M}$ 、Ser 部位に酸性側鎖をもつ TpYDR の場合 $K_d = 54 \mu\text{M}$ 、疎水性側鎖をもつ GpYLR の場合 $K_d = 26 \mu\text{M}$ 、塩基性側鎖をもつ ApYRR の場合 $K_d = 27 \mu\text{M}$ 、Arg 部位に酸性側鎖をもつ GpYMD の場合 $K_d = 73 \mu\text{M}$ 、極性側鎖をもつ GpYSS の場合 $K_d = 58 \mu\text{M}$ と各アミノ酸置換された変異体に対して、親和性の差が認められた(図3-26(B), (C), (D))。GpYSR20/Rev 複体の GpYSR 認識様式は、リン酸化チロシン残基に対して高選択的であるが、Gly, Ser, Arg 部位も分子認識に寄与することが示された。これらの結果から GpYSR20/Rev 複合体は、リン酸化タンパク質に対する人工リセプターとして、同一タンパク質中のチロシンリン酸化部位あるいは異なるリン酸化タンパク質のチロシンリン酸化部位を識別できる可能性が示唆できた。

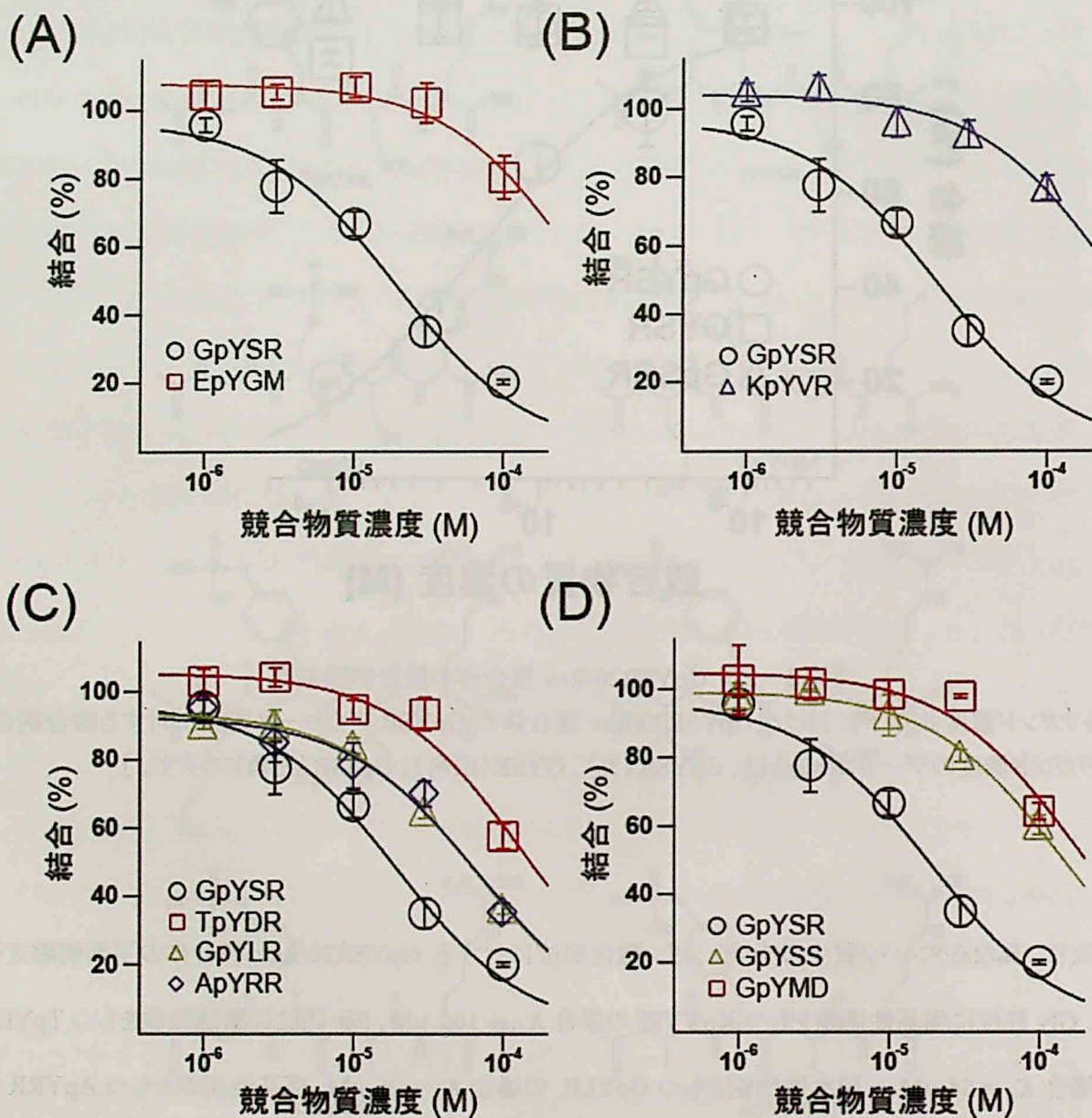


図3-26 GpYSR20/Rev 複合体の競合試験結果

[各リガンド濃度共存下における GpYSR20/Rev 複体の GpYSR アガロース樹脂に対する結合割合: 各リガンド濃度のデータポイントは、(A) EpYGM (赤四角)、(B) KpYVR (青三角)、(C) TpYDR (赤四角)、GpYLR (緑三角)、ApYRR (青ダイヤ)、(D) GpYSS (緑三角)、GpYMD (赤四角) で示し、(A) (B) (C) (D) の全てに GpYSR (丸) を示した。]

3-2-13 GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドセンサーの選別

樹脂濃度を下げることで選択圧を厳しくした条件下で選択された GpYSR20/Rev 複合体は、基質部位特異的に識別するリセプターであることが明らかになった。次に、リセプターからセンサーへの機能改変が可能であるか検討した。3-2-9で選択された RNA サブユニットと蛍光修飾 Rev ペプチドを組み合わせて用いることによって、蛍光変化を誘起するリボヌクレオペプチドセンサーを選別した(図3-27)。使用した蛍光修飾 Rev ペプチドは、5FAM-Rev、7mC-Rev、Pyr-Rev、NBD-Rev の四種類の蛍光修飾 Rev ペプチドを用いた。RNA クローンは、選択の中から複数の同一配列が得られた GpYSR20 と GpYSR19 と保存配列 5'-AUCAG---GAG-3' のうち二塩基が異なる GpYSR35 の三種類の RNA を用いた。蛍光性 GpYSR センサーのスクリーニングは、蛍光修飾 Rev ペプチドと RNA を複合体形成させて、96 穴のプレートの溝の中に独立的に溶液を入れて蛍光強度を測定することによって評価した。

GpYSR20 に関して、5FAM-Rev、7mC-Rev、Pyr-Rev、NBD-Rev の四種類の蛍光修飾 Rev ペプチドを用いた場合、GpYSR 濃度増加に伴った蛍光強度の変化が観測された。1 mM GpYSR 存在下で 5FAM-Rev に由来する相対蛍光強度が 1.5 で最も大きい変化量を示した。GpYSR35 に関して、5FAM-Rev に由来する相対蛍光強度が 1.2 ぐらいの変化量を示したが、7mC-Rev、Pyr-Rev、NBD-Rev の三種類の蛍光修飾 Rev ペプチドでは顕著な差が認められなかった。GpYSR19 は、5FAM-Rev と NBD-Rev において相対蛍光強度の上昇が認められたが、7mC-Rev、Pyr-Rev の蛍光修飾 Rev ペプチドでは顕著な差が認められなかった。5FAM-Rev は、GpYSR20、GpYSR35、GpYSR19 のどのクローンに対しても GpYSR 依存的な蛍光強度変化を示したことより、樹脂濃度を下げることで選択圧を厳しくした条件下で選択された GpYSR に対して親和性が向上したクローンにとって、最適な蛍光分子であることを示唆する結果が得られた。

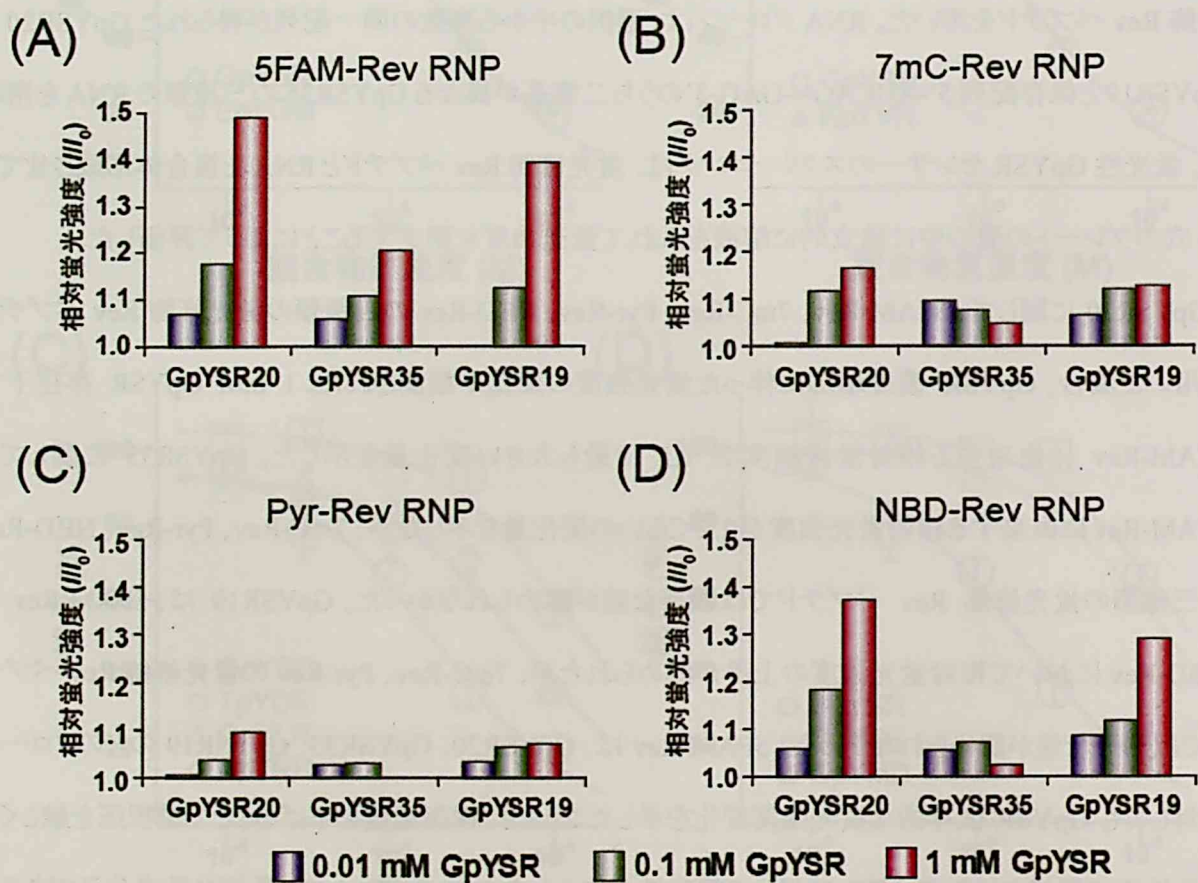


図3-27 各 0.01, 0.1, 1 mM GpYSR 存在下での(A)FAM-Rev、(B)7mC-Rev、(C)Pyr-Rev、(D)NBD-Rev と各 GpYSR RNA クローン複合体の相対蛍光強度の比較

3-2-14 GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドセンサーの機能評価

蛍光修飾 Rev ペプチドを用いた網羅的な蛍光センサーの選別の結果、蛍光分子の種類の違いによって、GpYSR 結合時に蛍光特性が異なるリボヌクレオペプチドセンサーが得られた。次に、Rev ペプチド N 末端に蛍光分子を導入しても、リセプターと同じ基質選択性と親和性を保持するかどうかを調べるために、GpYSR20/5FAM-Rev 複合体のリボヌクレオペプチドセンサーとしての機能評価を行った。蛍光スペクトルの測定により、GpYSR20/5FAM-Rev 複合体は GpYSR 濃度増加と共にフルオレセイン分子に由来する蛍光強度増加の変化が観測できた(図3-28(A))。300 μ M GpYSR 存在下において、GpYSR20/5FAM-Rev 複合体の蛍光強度変化の飽和点を観測した。各 GpYSR 濃度での蛍光強度変化から与えられる滴定曲線から求められた GpYSR20/5FAM-Rev 複合体の平衡解離定数が $K_d = 4.0 \pm 0.5 \mu$ M であった(図3-28(B))。GpYSR20/Rev 複合体の平衡解離定数は $K_d = 4.8 \mu$ M であり、フルオレセイン分子を導入しても親和性の低下が認められなかった。

次に、3-2-12で使用した競合物質を用いて GpYSR20/5FAM-Rev 複合体の各競合物質濃度増加に伴った蛍光強度をマイクロプレートリーダーを用いて測定した。チロシンリン酸化部位の誘導体である GYSR、GpSSR の 1 μ M から 300 μ M 存在下において蛍光強度変化がみられなかったことから(図3-28(B))、リン酸化チロシン部位の芳香環とリン酸基は、GpYSR とリボヌクレオペプチドセンサーの三者間の複合体形成の相互作用様式に関与することが明らかになった。また、GpYSR と同じ EBNA2 co-activator 中に含まれるタンパク質中のチロシンリン酸化部位 EpYGM に対する GpYSR20/5FAM-Rev 複合体の平衡解離定数は $K_d = 378 \pm 45 \mu$ M で、GpYSR に対する平衡解離定数 $K_d = 4.0 \mu$ M であったことより、約 95 倍の親和性の差が認められた(図3-28(C))。

異なるタンパク質中のチロシンリン酸化部位に対する GpYSR20/5FAM-Rev 複合体の平衡解離定数は、Gly 部位に塩基性側鎖をもつ KpYVR の場合 $K_d = 328 \pm 51 \mu$ M、Ser 部位に酸性側鎖をもつ TpYDR の場合 $K_d = 121 \pm 15 \mu$ M、疎水性側鎖をもつ GpYLR の場合 $K_d = 54 \pm 10 \mu$ M、塩基性側鎖をもつ ApYRR の場合 $K_d = 49 \pm 9.5 \mu$ M、Arg 部位に酸性側鎖をもつ GpYMD の場合 $K_d = 240 \pm 46 \mu$ M、極性側鎖をもつ GpYSS の場合 $K_d = 68 \pm 13 \mu$ M と各アミノ酸置換された変異体に対して、親和性の差が認められた(図3-29(A), (B), (C))。GpYSR20/5FAM-Rev 複合体の分子認識様式は、リン酸化チロシン部位を特に強く認識し、リン酸化チロシン周辺の Gly, Ser, Arg 部位もリボヌクレオペプチドとの相互

作用に関与することが明らかになった。また、GpYSR20/5FAM-Rev 複合体の基質分子に対する相互作用様式は、GpYSR20/Rev 複合体の選択性と親和性を損なわない結果であった。リボヌクレオペプチドリセプター・センサー構築方法論は、シグナル伝達経路に関わる特定のタンパク質チロシンリン酸化部位に対する蛍光センサーの作製法として適用可能であることを示した。

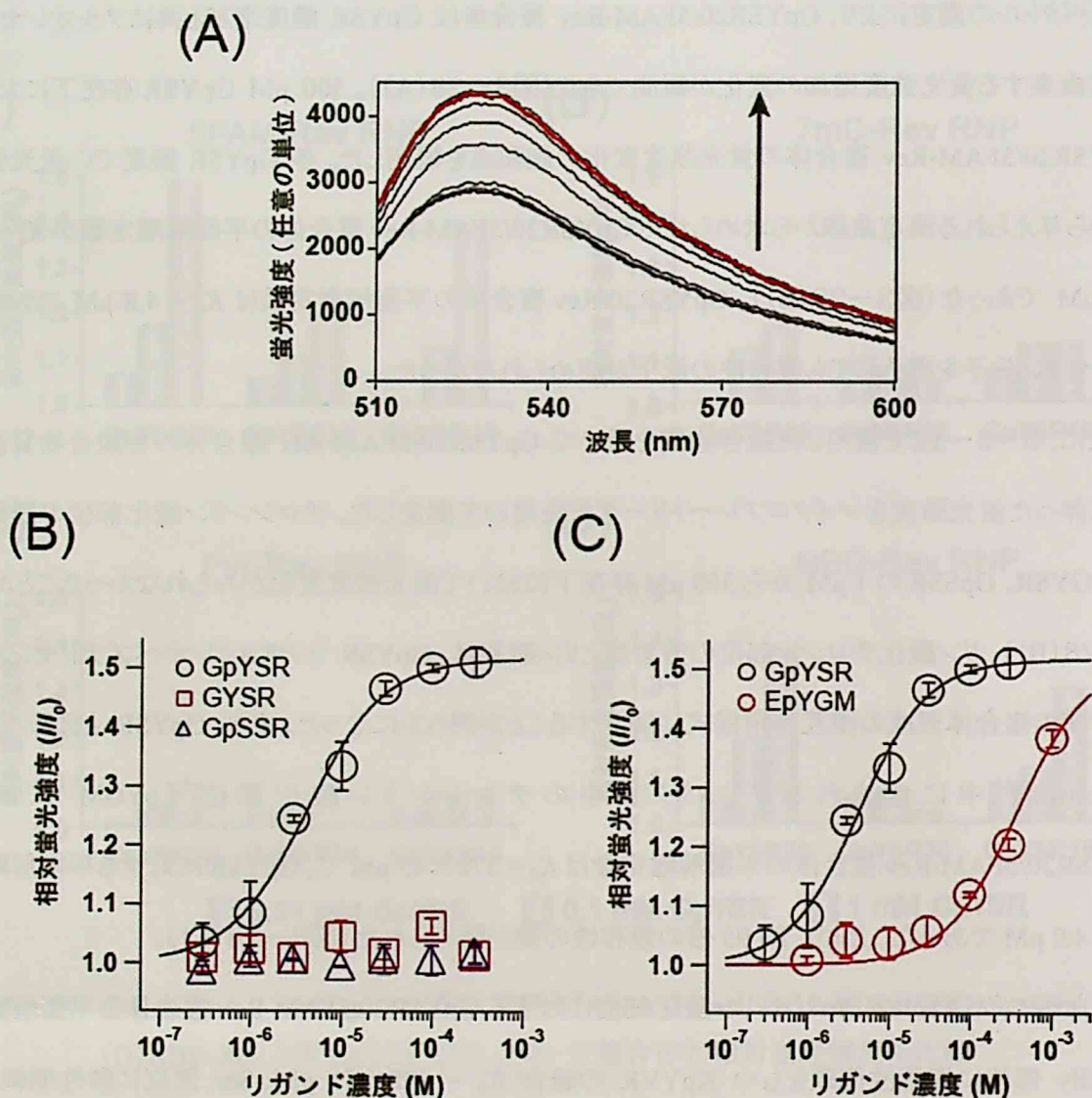
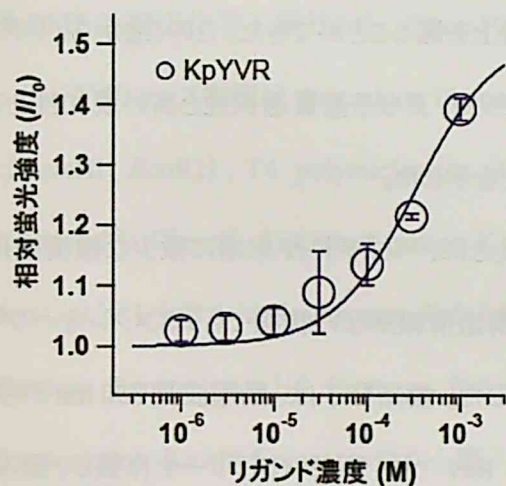


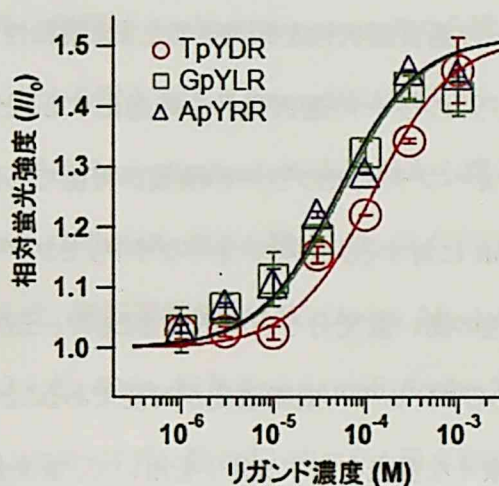
図3-28 蛍光測定による GpYSR20/5FAM-Rev 複合体の機能評価

[(A) 励起波長 494 nm で励起した GpYSR20/5FAM-Rev 複合体の蛍光スペクトル。矢印は、各 GpYSR 濃度 (0, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 μ M) 増加による蛍光変化の方向を示す。赤線は GpYSR が非存在下、青線は GpYSR 濃度 300 μ M 存在下である。(B) (C) GpYSR20/5FAM-Rev 複合体の各リガンド濃度共存下における蛍光強度変化をプロットした。各リガンド濃度のデータポイントは、GpYSR (黒丸)、GYSR (赤四角)、GpSSR (青三角)、EpYGM (赤丸) で示す。]

(A)



(B)



(C)

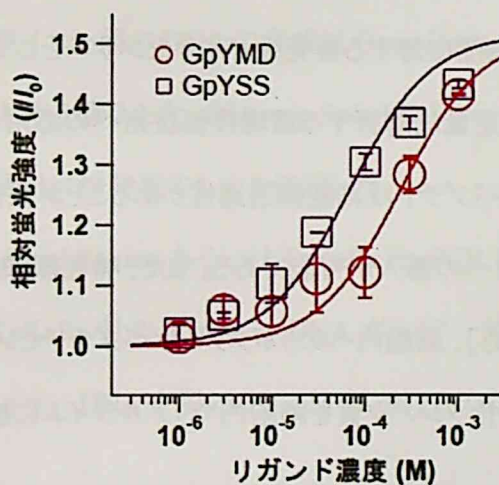


図3-29 GpYSR20/5FAM-Rev 複合体の競合物質に対する滴定曲線

[GpYSR20/5FAM-Rev 複合体の各リガンド濃度共存下における蛍光強度変化をプロットした。各リガンド濃度のデータポイントは、(A) KpYVR (青丸)、(B) TpYDR (赤丸)、GpYLR (緑四角)、ApYRR (青三角)、(C) GpYMD (赤丸)、GpYSS (紫四角) で示す。]

3-3 結論

リボヌクレオペプチド機能化法によって、天然タンパク質中のチロシンリン酸化部位を認識するリボヌクレオペプチドリセプターの作製を行った。GpYSR を認識するリボヌクレオペプチドリセプターは、リン酸化チロシン部位の芳香環とリン酸基を高選択的に認識し、リン酸化チロシン周辺のアミノ酸配列も認識するリセプターが構築できた。選択圧の条件を変えることで、GpYSR に対するリボヌクレオペプチドリセプターの基質選択性を保持させたまま親和性の向上を図ることができた。このことから、リボヌクレオペプチドリセプターの選択条件を最適化することによって、更なる基質選択性と高い親和性を有するリボヌクレオペプチドリセプターの構築が可能であることを示した。

GpYSR に対するリボヌクレオペプチドリセプターをもとに、ペプチド N 末端に微少な環境変化に対して感受性の高い蛍光分子を導入することで、三次元構造情報がない状態でもリボヌクレオペプチドリセプターからセンサーへ機能改変が可能であることも示した。蛍光分子は、励起波長 350 nm から 650 nm の間で様々な蛍光を発する分子を用いて、蛍光修飾 Rev ペプチドライブラリーを作製し、望みの蛍光特性を有する蛍光センサーを選別する為のライブラリーを構築した。RNA ライブラリーと蛍光修飾 Rev ペプチドライブラリーを組み合わせた網羅的な選別によって作製される蛍光性バイオセンサーは、多種多様なタンパク質リン酸化部位に対する蛍光性バイオセンサーとして適用できるだけでなく、環境汚染物質や環境ホルモンなどを定量的解析する環境評価技術への応用が可能になると期待される。

本研究で使用した Rev ペプチドは細胞膜透過性があることが報告されていることから[32]、蛍光修飾 Rev ペプチドは、細胞内への導入が可能である。また、哺乳類細胞内において RNA 発現システムが構築されていることから[33]、細胞内へのリボヌクレオペプチドセンサーの導入が可能になり、シグナル伝達経路に関わるリン酸化タンパク質を細胞内でリアルタイムに検出できる技術への展開が期待される。

3-4 実験の部

3-4-1 試薬

側鎖を保護した Fmoc (9-fluorenylmethoxycarbonyl) アミノ酸と HBTU (*N*-[(dimethylamino)-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridin-1-ylmethylene]-*N*-methylmethanaminium hexafluorophosphate *N*-oxide) とペプチド合成用 DMF は渡辺化学工業社から、Fmoc-PAL-PEG 樹脂は Applied Biosystems 社から購入した。スクシンイミドアガロース樹脂は Amersham Pharmacia 社から購入した。Klenow DNA ポリメラーゼ、制限酵素 (*Bam*HI、*Eco*RI)、T4 polynucleotide キナーゼは New England Biolab 社から購入した。Pyrobest DNA ポリメラーゼ、TaKaRa Ligation Kit Ver.2 は TaKaRa 社から購入した。ライブラリー作製用 DH5 α コンピテントセルは Invitrogen 社から購入した。逆転写酵素[AMV (Avian Myeloblastosis Virus) Reverse Transcriptase]は Promega 社から購入した。RNA 転写キット(Ampli Scribe T7 High Yield Transcription Kit)は Epicentre 社から購入した。セモリブデン酸六アンモニウム四水和物、ヒドロキノン、亜硫酸ナトリウムは和光純薬社から購入した。リン酸二水素カリウム、Bacto Trypton、Yeast Extract、Bacto Agar はナカライテスク社より購入した。DNA ライブラリー用の DNA の合成は Amersham Pharmacia 社に依頼した。PCR プライマー用の DNA の合成は Gene Design 社に依頼した。放射性アイソトープは Amersham Pharmacia 社から購入した。QIAprep Spin Mini Prep Kit は Qiagen 社から購入した。その他の試薬は分子生物学用もしくは特級のものを使用した。

PCR は BIO-RAD 社 iCycler Thermal Cycler あるいは TaKaRa 社 PCR Thermal Cycler PERSONAL を使い、標準的な PCR 反応は、TaKaRa 社の Pyrobest DNA ポリメラーゼを用いて、添付の Pyrobest Buffer II 反応液中 0.5 μ M のプライマー-DNA を使い 0.2 mM の dNTP の条件で行った。

3-4-2 ランダム領域の塩基長が異なる DNA ライブラリーの作製

40 塩基のランダムな塩基配列を含む鋳型 DNA (RRE N40) [5'-GGAATAGGTCTGGGCGCA-N₄₀-P(OH)-3'] と RRE N40 の 3'末端領域に相補的な REV N7 プライマー (5'-GGAATAGGCCTGTACCGTCA-N₇-OH-3') を 90°C で 3 分間静置後、すぐに氷温下にすることでアニーリングさせた後に、Klenow DNA ポリメラーゼにより 37°C、60 分間の反応により 2 本鎖 DNA

を合成した。Klenow DNA ポリメラーゼ反応後、65℃、5 分間静置することで Klenow DNA ポリメラーゼを失活させた。作製した 2 本鎖 DNA (100 ng) を用いて、T7 プロモーターを含む FOR 01 プライマー (5'-TCTAATACGACTCACTATAGGAATAGGTCTGGGCGCA-3')、REV 04 プライマー (5'-GGAATAGGCCTGTACCGTC-3') を用いて、変性 94 °C、30 秒、アニーリング 55 °C、30 秒、伸長反応 72 °C、1 分の条件により 4 サイクルの PCR 反応を行うことで、ランダムな 7 塩基長から 40 塩基長を含む 2 本鎖の DNA ライブラリーを構築した。

3-4-3 ランダム領域の塩基長が異なる RNA ライブラリーの作製

1 µg のランダムな 7 塩基長から 40 塩基長を含む 2 本鎖 DNA を鋳型として用い、Epicentre 社 Ampli Scribe T7 High Yield Transcription Kit を用いて、20 µL の容量で 37 °C で 3 時間反応させることにより RNA を転写した。転写反応終了後、1 U の DNaseI を加え 37 °C で 15 分間反応を行い、鋳型 DNA を分解した。転写した RNA は酢酸ナトリウム存在下エタノール沈殿を行った。RNA サンプルは 90 %ホルムアミド水溶液に溶解し、80 °C で 3 分間の熱処理を行った後、氷上で急冷して変性させ、6 M 尿素を含んだ 8 %ポリアクリルアミド変性ゲルにより精製した。TLC 板の上で UV を照射し目的分子量の RNA のバンドを確認した上で切り出し、TE 緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 7.6)、1 mM EDTA] で 4 °C、12 時間抽出した。抽出した RNA は酢酸ナトリウム存在下エタノール沈殿を行った。精製した RNA は 10 µM となるように 10 mM Tris-HCl (pH 7.6)、150 mM NaCl を含んだバッファーに希釈し 80 °C で 3 分加熱した後、すぐに氷温下にするすることで適切な 2 次構造を形成するようにした。

3-4-4 リン酸化チロシンを含むテトラペプチドの合成

Fmoc 固相合成法により化学合成した。樹脂は Fmoc-PAL-PEG resin (0.38 mmol/g) を用いた。縮合は、樹脂に対して 10 当量の Fmoc アミノ酸、10 当量の HBTU を 5 %のジイソプロピルエチルアミンを含む DMF に溶解したものを加え、60 分攪拌することで行った。ペプチドの N 末端の Fmoc 基を除去した後、0.5M 1-メチルイミダゾールと 0.5M 無水酢酸を用いてペプチドの N 末端をアセチル化した。樹脂からの切り出しおよび側鎖の脱保護は、フェノール (0.75 g)、チオアニソール (0.5 mL)、エタンジチオール (0.25 mL)、蒸留水 (0.5 mL)、トリフルオロ酢酸 (10 mL) の混合溶液を、氷上乾燥させた樹脂に加え、3

時間攪拌した。反応終了後、樹脂をろ別し、エーテル沈殿により Rev ペプチドを回収した。沈殿を水に溶解させ、エーテルによる洗浄後、逆相 HPLC により精製した(溶離液 A 0.2 %トリフルオロ酢酸水溶液、溶離液 B 0.2 %トリフルオロ酢酸を含む 50 %アセトニトリル水溶液)。精製には、信和化工社の Ultron VX-Peptide (20 x 250 mm) と Amersham Pharmacia 社の RESOURCE-RPC カラム (3 mL) の逆相 C18 カラムを用いた。分析には、信和化工社の Ultron VX-Peptide (4.6 x 150 mm) の逆相 C18 カラムを用いた。テトラペプチドの濃度は、リン酸化チロシンの吸光係数 ($\lambda_{267} = 500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) とチロシンの吸光係数 ($\lambda_{274} = 1420 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) により決定した。ペプチドの同定には、Applied Biosystems 社の Voyager MALDI-TOF マススペクトルと JEOL 社の NMR spectrometer JNM-ECP300 により行った。

GpYSR (H-Gly-pTyr-Ser-Arg-NH₂). ¹H NMR (300 MHz, D₂O-*d*₂): δ 1.54-1.90 (m, 4 H), 2.93-3.10 (m, 2 H), 3.17 (m, 2H) 3.69-3.82 (m, 4 H), 4.23 (m, 1 H), 4.37 (m, 1 H), 4.64 (m, 1 H), 7.08 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H), 7.17 (d, $J = 7.7$ Hz, 2 H); TOF-Mass: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd. 583.49, found 583.73.

GYSR (H-Gly-Tyr-Ser-Arg-NH₂). ¹H NMR (300 MHz, D₂O-*d*₂): δ 1.56-1.98 (m, 4 H), 2.90-3.05 (m, 2 H), 3.19 (m, 2 H), 3.72-3.85 (m, 4 H), 4.24 (m, 1 H), 4.39 (m, 1 H), 4.62 (m, 1 H), 6.80 (d, $J = 7.4$ Hz, 2 H), 7.11 (d, $J = 7.7$ Hz, 2 H); TOF-Mass: $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd. 503.51, found 503.85.

GpSSR (H-Gly-pSer-Ser-Arg-NH₂). ¹H NMR (300 MHz, D₂O-*d*₂): δ 1.53-1.98 (m, 4 H), 3.20 (m, 2 H), 3.82-3.97 (m, 2 H), 4.12-4.27 (m, 2 H), 4.32 (m, 1 H), 4.48 (m, 1 H), 4.70 (m, 1 H); TOF-Mass: $[\text{M}+\text{K}]^+$ calcd. 523.5, found 523.76

LpYSR (H-Leu-pTyr-Ser-Arg-NH₂). ¹H NMR (300 MHz, D₂O-*d*₂): δ 0.92 (m, 6 H), 1.56-1.92 (m, 4 H), 3.05 (m, 2 H), 3.21 (m, 2 H), 3.75 (m, 2 H), 3.99 (m, 1 H), 4.24 (m, 1 H), 4.38 (m, 1 H), 4.67 (m, 1 H), 7.11 (d, $J = 7.7$ Hz, 2 H), 7.21 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H); TOF-Mass: $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd. 617.61, found 617.65.

GpYAR (H-Gly-pTyr-Ala-Arg-NH₂). ¹H NMR (300 MHz, D₂O-*d*₂): δ 1.22-1.42 (m, 3 H), 1.54-2.02 (m, 4 H), 2.96-3.25 (m, 4 H), 3.76 (m, 4 H), 4.30 (m, 2 H), 4.66 (m, 1 H), 7.13 (d, $J = 8.7$ Hz, 2 H), 7.23 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H); TOF-Mass: $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd. 545.51, found 545.8.

GpYSA (H-Gly-pTyr-Ser-Ala-NH₂). ¹H NMR (300 MHz, D₂O-*d*₂): δ 1.32 (m, 3 H), 2.88-3.06 (m, 2 H), 3.69 (m, 4 H), 4.16 (m, 1 H), 4.29 (m, 1 H), 4.57 (m, 1 H), 7.03 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H), 7.13 (d, $J = 8.5$ Hz, 2 H); TOF-Mass: $[\text{M}+2\text{Na}]^+$ calcd. 519.35, found 520.65.

GpYSR (Ac-Gly-pTyr-Ser-Arg-NH₂). ¹H NMR (300 MHz, D₂O-*d*₂): δ 1.05-1.32 (m, 4 H), 1.50 (s, 3 H), 2.39-2.69 (m, 4 H), 3.20-3.35 (m, 4 H), 3.73 (m, 1 H), 3.85 (m, 1 H), 4.06 (m, 1 H), 6.57 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H), 6.65 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H); TOF-Mass: [M+H]⁺ calcd. 603.54, found 603.78.

GYSR (Ac-Gly-Tyr-Ser-Arg-NH₂). ¹H NMR (300 MHz, D₂O-*d*₂): δ 1.62-2.00 (m, 4 H), 2.03 (s, 3 H), 2.95-3.13 (m, 2 H), 3.24 (m, 2 H), 3.79-3.97 (m, 4 H), 4.33 (m, 1 H), 4.39 (m, 1 H), 4.62 (m, 1 H), 6.87 (d, *J* = 8.2 Hz, 2 H), 7.15 (d, *J* = 8.2 Hz, 2 H); TOF-Mass: [M+H]⁺ calcd. 523.56, found 523.83.

GpSSR (Ac-Gly-pSer-Ser-Arg-NH₂). ¹H NMR (300 MHz, D₂O-*d*₂): δ 1.58-2.03 (m, 4 H), 2.08 (s, 3 H), 3.23 (m, 2 H), 3.86-4.07 (m, 4 H), 4.15-4.38 (m, 3 H), 4.49 (m, 1 H), 4.65 (m, 1 H); TOF-Mass: [M+H]⁺ calcd. 527.45, found 527.84.

EpYGM (Ac-Glu-pTyr-Gly-Met-NH₂). ¹H NMR (300 MHz, D₂O-*d*₂): δ 1.75-2.17 (m, 10 H), 2.22-2.40 (m, 2 H), 2.43-2.64 (m, 2 H), 2.94-3.01 (m, 1 H), 3.11-3.18 (m, 1 H), 3.77-3.94 (m, 2 H), 4.23 (m, 1 H), 4.44 (m, 1 H), 4.56 (m, 1 H), 7.10 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H), 7.19 (d, *J* = 8.2 Hz, 2 H); TOF-Mass: [M+Na]⁺ calcd. 642.57, found 642.96.

KpYVR (Ac-Lys-pTyr-Val-Arg-NH₂). ¹H NMR (300 MHz, D₂O-*d*₂): δ 0.88 (m, 6 H), 1.25 (m, 2 H), 1.58-1.81 (m, 8 H), 1.99 (m, 4 H), 2.88-3.07 (m, 4 H), 3.22 (m, 2 H), 4.00 (m, 1 H), 4.12-4.25 (m, 2 H), 7.09 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H), 7.17 (d, *J* = 8.2 Hz, 2 H); TOF-Mass: [M+H]⁺ calcd. 686.72, found 686.85.

TpYDR (Ac-Thr-pTyr-Asp-Arg-NH₂). ¹H NMR (300 MHz, D₂O-*d*₂): δ 1.05-1.17 (m, 3 H), 1.51-1.92 (m, 4 H), 2.04 (s, 3 H), 2.73 (m, 1 H), 2.89 (m, 1 H), 3.03 (m, 2 H), 3.17 (m, 2 H), 4.08 (m, 1 H), 4.22 (m, 2 H), 4.60 (m, 2 H), 7.09 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H), 7.17 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H); TOF-Mass: [M+H]⁺ calcd. 675.61, found 675.87.

GpYLR (Ac-Gly-pTyr-Leu-Arg-NH₂). ¹H NMR (300 MHz, D₂O-*d*₂): δ 0.87-0.94 (m, 6 H), 1.57-1.88 (m, 7 H), 2.05 (s, 3 H), 3.07 (m, 2 H), 3.23 (m, 2 H), 3.87 (m, 2 H), 4.25-4.36 (m, 2 H), 4.62 (m, 1 H), 7.14 (d, *J* = 8.7 Hz, 2 H), 7.20 (d, *J* = 8.2 Hz, 2 H); TOF-Mass: [M+H]⁺ calcd. 629.62, found 629.59.

ApYRR (Ac-Ala-pTyr-Arg-Arg-NH₂). ¹H NMR (300 MHz, D₂O-*d*₂): δ 1.32 (d, *J* = 7.1 Hz, 3 H), 1.46-1.93 (m, 8 H), 2.08 (s, 3 H), 3.01-3.27 (m, 6 H), 4.24 (m, 3 H), 4.57 (m, 1 H), 7.14 (d, *J* = 8.2 Hz, 2 H), 7.21 (d, *J* = 8.2 Hz, 2 H); TOF-Mass: [M+H]⁺ calcd. 686.68, found 686.66.

GpYMD (Ac-Gly-pTyr-Met-Asp-NH₂). ¹H NMR (300 MHz, D₂O-*d*₂): δ 1.86-2.05 (m, 8 H), 2.35-2.54 (m, 2 H), 2.76-3.12 (m, 4 H), 3.84 (m, 2 H), 4.39 (m, 1 H), 4.55 (m, 1 H), 4.65 (m, 1 H), 7.11 (d, *J* = 7.6 Hz, 2 H), 7.18 (d, *J* = 7.4 Hz, 2 H); TOF-Mass: [M+Na]⁺ calcd. 628.55, found 628.80.

GpYSS (Ac-Gly-pTyr-Ser-Ser-NH₂). ¹H NMR (300 MHz, D₂O-*d*₂): δ 1.99 (s, 3 H), 2.98-3.17 (m, 2 H), 3.77-3.95 (m, 6 H), 4.40-4.87 (m, 2 H), 4.65 (m, 1 H), 7.13 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H), 7.22 (d, *J* = 8.5 Hz, 2 H); TOF-Mass: [M+Na]⁺ calcd. 556.42, found 556.91.

3-4-5 GpYSR アガロース樹脂の合成

NHS 活性化アガロース樹脂を 4.5 mL 用いて固定化を行った。求核性化合物の吸着を除く為に、氷温で冷やした酸性溶液 9 mL (1 mM HCl) にて 3 回洗浄した。洗浄後、予め結合バッファー 8 mL (0.2 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH 8.3) に溶解させた H-Gly-pTyr-Ser-Arg-NH₂ (10 mM, 7.5 mL) あるいは H-Gly-pTyr-Ser-Arg-NH₂ (20 μM, 7.5 mL) を樹脂に対して速やかに加え、室温下で 2 時間振とうさせた。反応後キャッピングバッファー 9 mL (0.5 M Ethanolamine, 0.5 M NaCl, pH 8.3) にて 3 回洗浄後、酢酸バッファー 9 mL (0.1M Acetic acid, 0.5 M NaCl, pH 4.0) で 3 回洗浄した。さらにキャッピングバッファー (9 mL) 加え、室温下で 30 分間振とうさせた。キャッピングバッファーを取り除き、酢酸バッファー (9 mL) にて 3 回洗浄した。キャッピングバッファー (9 mL) で 3 回洗浄後、最初にキャッピングバッファーで溶出した溶液の吸光度 (280 nm) を測定し、スクシンイミドに由来する化合物がないことを確認した。確認後、酢酸バッファー (9 mL) にて 3 回洗浄した。最終的に 20% EtOH (6 mL) で 3 回洗浄後、20% EtOH に置換された状態で保存した。

3-4-6 GpYSR アガロース樹脂の固定化量の算出

基質分子を固定化させたアガロース樹脂は、Briggs のリン酸イオン定量法により算出した[34]。110°Cで乾燥したリン酸二水素カリウム (174.2 mg, 1 mmol) をメスフラスコにて蒸留水で 100 mL までメスアップした。この溶液をもとにリン酸二水素カリウム水溶液の濃度を 200, 400, 600, 800, 1000 μM となるように調製した。各濃度の水溶液を 100 μL に、下記に示した調製法に調製したモリブデン水溶液 (100 μL)、ヒドロキノン水溶液 (50 μL)、亜硫酸ナトリウム水溶液 (50 μL) と順次加え、この混合溶液を湯浴中

に約 60 秒浸した。発色を安定させる為に 15 分放置し、340 nm の吸光度を測定し、吸光度とリン酸イオン濃度からなる検量線を求めた。尚、ブランクは、蒸留水(100 μ L)にモリブデン水溶液(100 μ L)、ヒドロキノン水溶液(50 μ L)、亜硫酸ナトリウム水溶液(50 μ L)を加えた溶液を用いた。

基質分子を固定化させたアガロース樹脂は、200 μ L 樹脂容量をとり、それぞれ濃硫酸を一滴滴下し、200℃で 45 分間オイルバス上に温置した。蒸留水で 400 μ L までメスアップ後、100 μ L とり、モリブデン水溶液を 100 μ L 加えた。次にヒドロキノン水溶液を 50 μ L 加え、亜硫酸ナトリウム水溶液を 50 μ L 加えた。それぞれの混合溶液を湯浴中に約 20 秒浸した。発色を安定させるために 15 分放置した。340 nm の吸光度を測定した。

・モリブデン水溶液の調製:七モリブデン酸六アンモニウム四水和物 (5 g, 4 mmol)を蒸留水(60 mL)に溶解させ、75%硫酸(40 mL)を加えた。

・ヒドロキノン水溶液の調製:ヒドロキノン(0.5 g, 4.5 mmol)を蒸留水(100 mL)に溶解させ、ヒドロキノンの酸化阻害の為に濃硫酸を一滴滴下した。

・亜硫酸ナトリウム水溶液の調製:亜硫酸ナトリウム(4 g, 31 mmol)を蒸留水(20 mL)に溶解させた。

3-4-7 ネガティブ選択法を用いた GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドの選択

選択過程は、1 ラウンド目から 2 ラウンド目は GpY アガロース樹脂をとおさずに選択を行ったが、3 ラウンド目以降は GpY アガロース樹脂をとおしてから選択を行った。予め結合バッファー[10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.005% Tween20]にて平衡化させた GpY アガロース樹脂(6.2 μ mol/mL) 40 μ L 樹脂容量に対して、80℃で 3 分温置後、すぐに 4℃に急冷させることで会合させた 2 μ M RNA と 3 μ M Ac-Rev を加え、氷上で反応溶液 100 μ L を結合させた。30 分後に 4℃で 1 分間遠心し、上澄を GpYSR アガロース樹脂(9.2 μ mol/mL) 40 μ L 樹脂容量に対して加え、さらに氷上 30 分間結合させた。結合反応後、上澄を除いた後、樹脂は 300 μ L の結合バッファーで、5000 g、4℃で 1 分間遠心し、上澄を除去する操作を 3 回繰り返して洗浄した。樹脂に結合した RNA は、0.2 mM GpYSR を含んだ結合バッファー100 μ L で溶出させ、これを 2 回繰り返し、酢酸ナトリウム存在下エタノール沈殿を行い RNA を回収した。

RNA を 10 μ L TE[10 mM Tris-HCl(pH 7.6)、1 mM EDTA]に溶解し、3 μ L の RNA を鋳型として、

12 μ M の REV 01 プライマー存在下、80 $^{\circ}$ C 3 分間加熱後、30 分間かけて 25 $^{\circ}$ C まで徐冷しアニーリングさせた後、反応液 20 μ L で逆転写反応 (42 $^{\circ}$ C、30 分間) を行った。反応液を 99 $^{\circ}$ C、5 分間加熱処理し逆転写酵素を失活させた後、反応液の 1/10 量について REV 04、FOR 01 プライマーを用いて、変性 98 $^{\circ}$ C、10 秒、アニーリング 55 $^{\circ}$ C、30 秒、伸長反応 72 $^{\circ}$ C、30 秒の条件で PCR を行った。4 サイクル毎に 20 サイクルまで反応液を分取し、8 % 非変性ポリアクリルアミド (アクリルアミド:ビスアクリルアミド = 29:1) 電気泳動により増幅 DNA を分析した。ポリアクリルアミド電気泳動での分析により、指数的に DNA の増幅が確認される最小のサイクル数で PCR を行い、新たな DNA ライブラリーを調製した。PCR 産物は、酢酸アンモニウム溶存在下 2-プロパノール沈殿により精製し、次のセレクションに供した。

3-4-8 基質濃度を段階的に下げた選択法による GpYSR 結合性リボヌクレオペプチドの選択

1 ラウンド目から 2 ラウンド目において、予め結合バッファー [10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.005% Tween20] にて平衡化させた GpYSR アガロース樹脂 (9.2 μ mol/mL) 20 μ L 樹脂容量に対して、80 $^{\circ}$ C で 3 分温置後、すぐに 4 $^{\circ}$ C に急冷させることで会合させた 2 μ M RNA と 3 μ M Ac-Rev を加え、氷上で反応溶液 50 μ L を結合させた。結合反応 30 分後に、4 $^{\circ}$ C で 5000g で二分間遠心した。乾燥した樹脂に冷やした 300 μ L の結合バッファーを加え、すぐに遠心した。この洗浄サイクルを 3 回繰り返した。樹脂に結合した RNA は、0.2 mM GpYSR を含んだ結合バッファー 100 μ L で溶出させ、これを 2 回繰り返し、酢酸ナトリウム存在下エタノール沈殿を行い RNA を回収した。

3 ラウンド目から以降は GpYSR 樹脂 (2.7 nmol/mL) 2 μ L 樹脂容量にに対して、80 $^{\circ}$ C で 3 分温置後、すぐに 4 $^{\circ}$ C に急冷することで会合させた 2 μ M RNA と 3 μ M Ac-Rev を加え、氷上で反応溶液 50 μ L を結合させた。結合反応 30 分後に、4 $^{\circ}$ C で 5000g で二分間遠心した。乾燥した樹脂に冷やした 300 μ L の結合バッファーを加え、5 分間経った後に遠心した。この 5 分間の洗浄時間をおいた洗浄方法を 3 回繰り返した。樹脂に結合した RNA は、0.2 mM GpYSR を含んだ結合バッファー 100 μ L で溶出させ、これを 3 回繰り返し、酢酸ナトリウム存在下エタノール沈殿を行い RNA を回収した。

RNA を 10 μ L TE [10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA] に溶解し、3 μ L の RNA を鋳型として、12 μ M の REV 01 プライマー存在下、80 $^{\circ}$ C 3 分間加熱後、30 分間かけて 25 $^{\circ}$ C まで徐冷しアニーリングさせた後、反応液 20 μ L で逆転写反応 (42 $^{\circ}$ C、30 分間) を行った。反応液を 99 $^{\circ}$ C 5 分間加熱処

理し逆転写酵素を失活させた後、反応液の 1/10 量について REV 04、FOR 01 プライマーを用いて、変性 98 °C、10 秒、アニーリング 55 °C、30 秒、伸長反応 72 °C、30 秒の条件で PCR を行った。4 サイクル毎に 20 サイクルまで反応液を分取し、8 %非変性ポリアクリルアミド(アクリルアミド:ビスアクリルアミド=29:1)電気泳動により増幅 DNA を分析した。ポリアクリルアミド電気泳動での分析により、指数的に DNA の増幅が確認される最小のサイクル数で PCR を行い、新たな DNA ライブラリーを調製した。PCR 産物は、酢酸アンモニウム溶存在下 2-プロパノール沈殿により精製し、次のセレクションに供した。

3-4-9 選択されたリボヌクレオペプチドの RNA 配列解析

第二章の実験の部2-4-6と同様の方法で行った。

3-4-10 クローニングを行ったプラスミド DNA の配列解析

第二章の実験の部2-4-7と同様の方法で行った。

3-4-11 配列解析を行ったプラスミド DNA から RNA の調製

配列確認を行ったプラスミド DNA 2 ng を用い 100 µL の容量で、FOR 03 プライマー (5'-GAATTCTAATACGACTCACTATAGG-3')、REV 04プライマーを用いて変性 94 °C 30 秒、アニーリング 55 °C 30 秒、伸長反応 72 °C 1 分の条件で 30 サイクル反応を行った。PCR 産物は酢酸アンモニウム存在下 2-プロパノール沈殿を行った。精製した DNA は TE 緩衝液に溶解し、前述した方法により RNA を転写した後、変性ゲルを用いて精製した。

3-4-12 RNA の 5'末端標識

第二章の実験の部2-4-9と同様の方法で行った。

3-4-13 リボヌクレオペプチドリセプターと GpYSR アガロース樹脂との結合試験

樹脂量として 20 µL の GpYSR アガロース樹脂に RNA (最終濃度 1 µM) と Rev ペプチド (最終濃度 1 µM) を加えた結合バッファー [10 mM Tris-HCl (pH7.6)、100 mM KCl、10 mM MgCl₂、0.005%

Tween20]中、氷上 30 分間反応させた。反応液を 5000 g、4 °Cで 1 分間遠心により濾過した後、樹脂は 400 µL の結合バッファーで、5000 g、4 °Cで 1 分間遠心により洗浄した。樹脂に結合した RNA は、0.2 mM GpYSR を含んだバッファー100 µL で溶出させ、これを 2 回繰り返した。洗浄液中、回収液中、さらに樹脂の放射活性をチェレンコフ法により測定し、それぞれを非結合画分、特異的結合画分、非特異的結合画分とした。結合反応に用いた RNA の放射活性に対し、得られた RNA の放射活性から非結合画分(%）、特異的結合画分(%）、非特異的結合画分(%)を算出した。

3-4-14 リボヌクレオペプチドリセプターと GpYSR の平衡解離定数の測定

各樹脂容量の GpYSR アガロース樹脂に RNA (最終濃度 1 µM) と Rev ペプチド (最終濃度 1 µM) を加えた結合バッファー[10 mM Tris-HCl(pH7.6)、100 mM KCl、10 mM MgCl₂、0.005% Tween20]中、氷上 30 分間反応させた。反応液を 1000 g、4 °Cで 1 分間遠心によりろ過した後、樹脂は 200 µL の結合バッファーで、1000 g、4 °Cで 1 分間遠心する操作を 2 回繰り返して洗浄した。樹脂に結合した RNA を 0.2 mM GpYSR を含んだバッファー150 µL で溶出し、これを 2 回繰り返した。洗浄液中、回収液中、さらに樹脂の放射活性をチェレンコフ法により測定し、それぞれ非結合画分、特異的結合画分、非特異的結合画分とした。結合反応に用いた RNA の放射活性に対し、得られた RNA の放射活性から非結合画分(%）、特異的結合画分(%）、非特異的結合画分(%)を算出した。リボヌクレオペプチドリセプターの GpYSR との解離定数 K_d は、以下の理論式に従って算出した。解析ソフトには Igor Pro を用いた。

$$F = \frac{([RNA-ペプチド複合体] + [GpYSR] + K_d) - \{([RNA-ペプチド複合体] + [GpYSR] + K_d)^2 - 4 \times [RNA-ペプチド複合体][GpYSR]\}^{1/2}}{2 \times [RNA-ペプチド複合体]}$$

F は GpYSR に結合した RNA-ペプチド複合体の割合、[] は各濃度を示す。データは平均 ± 標準偏差により表記した。

3-4-15 リボヌクレオペプチドリセプターの競合試験

樹脂量として 2 µL の GpYSR アガロース樹脂に最終濃度 1 µM となるように RNA、1 µM Rev を加えたのち結合バッファー [10 mM Tris-HCl(pH7.6)、100 mM KCl、10 mM MgCl₂、0.005% Tween20] 中、各濃度の競合物質を加えて氷上 30 分間反応させた。反応液を 5000 g、4 °Cで 1 分間遠心により濾過

した後、樹脂は 200 μ L の結合バッファーで、5000 g、4 $^{\circ}$ C で 1 分間遠心する操作を 2 回繰り返して洗浄した。樹脂に結合した RNA は、0.2 mM GpYSR を含んだバッファー 150 μ L で溶出させ、これを 2 回繰り返した。洗浄液中、回収液中、さらに樹脂の放射活性をチェレンコフ法により測定し、それぞれ非結合画分、特異的結合画分、非特異的結合画分とした。結合反応に用いた RNA の放射活性に対し、得られた RNA の放射活性から非結合画分(%)、特異的結合画分(%)、非特異的結合画分(%)を算出した。

$$F = \frac{((K_d + K_d [\text{競合物質}]/K_d' + [\text{GpYSR}] + [\text{RNA-ペプチド複合体}] - ((K_d + K_d [\text{競合物質}]/K_d' + [\text{GpYSR}] + [\text{RNA-ペプチド複合体}])^2 - 4[\text{GpYSR}][\text{RNA-ペプチド複合体}]))^{1/2}}{(2[\text{RNA-ペプチド複合体}])}$$

F は GpYSR に結合した RNA-ペプチド複合体の割合、 K_d は RNA-ペプチド複合体と GpYSR との平衡解離定数、 K_d' は RNA-ペプチド複合体と競合物質の平衡解離定数、 $[\]$ は各濃度を示す。データは平均 \pm 標準偏差により表記した。

3-4-16 リボヌクレオペプチドセンサーの 96 穴プレートを用いた蛍光測定

蛍光測定は、Perkin Elmer 社 Wallac ARVOsx 1420 multilabel counter を用いて行った。測定に使用した RNA は、塩濃度 10 mM Tris (pH 7.6), 150 mM NaCl 存在下で 80 $^{\circ}$ C, 3 分放置後、4 $^{\circ}$ C に急冷させてから使用した。測定溶液 100 μ L 中には、各基質濃度となるように調製し、1 μ M RNA, 1 μ M 蛍光修飾 Rev 存在下で終塩濃度は、10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 100 mM NaCl, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.005% Tween20 にて測定した。プレートに試料溶液を加えた後、Wallac ARVOsx 1420 multilabel counter で 1 分間の攪拌後、20 $^{\circ}$ C で 30 分間静置してから各蛍光分子に適した波長で蛍光強度を測定した。7mC-Rev と Pyr-Rev 誘導体は 350 nm の波長で励起し、390 nm の発光波長を測定した。6FAM-Rev 誘導体は 485 nm の波長で励起し、535 nm の発光波長を測定した。NBD-Rev 誘導体は 475 nm の波長で励起し、535 nm の発光波長を測定した。Cy5-Rev 誘導体は 650 nm の波長で励起し、670 nm の発光波長を測定した。

3-4-17 リボヌクレオペプチドセンサーの蛍光測定

蛍光測定は、HITACHI F4500 を用いて行った。蛍光測定条件は、励起スリットと蛍光スリット幅は 5 nm、ホトマル電圧 700V の設定で測定した。7mC-Rev を使用した場合は、 $\lambda_{ex} = 355$ nm の励起波長で測定波長範囲 370~470 nm を測定した。5FAM-Rev は、 $\lambda_{ex} = 494$ nm の励起波長で測定波長範囲 510~600 nm を測定した。測定溶液中の終塩濃度は、10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂ で測定溶液量を 250 μ L として、0.5 μ M RNA, 0.5 μ M 蛍光修飾 Rev、各基質濃度の存在下で蛍光スペクトルを測定した。

$$F = A \left(\frac{[\text{蛍光性RNA-Rev複合体}] + [\text{GpYSR}] + K_D}{([\text{蛍光性RNA-Rev複合体}] + [\text{GpYSR}] + K_D)^2 - 4[\text{蛍光性RNA-Rev複合体}][\text{GpYSR}]} \right)^{1/2} / 2[\text{蛍光性RNA-Rev複合体}]$$

蛍光性 RNA-ペプチド複合体と基質分子存在下での蛍光強度 (I)、蛍光性 RNA-ペプチド複合体と基質分子非存在下での蛍光強度 (I_0) とした相対的蛍光強度 (I/I_0) を F 、 A は結合飽和における 1-相対的蛍光強度 (I/I_0) の値、 $[]$ は各濃度を示す。データは平均 \pm 標準偏差により表記した。

引用文献

- [1] Samelson, L. E. *Annu. Rev. Immunol.* **2002**, 20, 371.
- [2] Johnson, L. N.; Lewis, R. J. *Chem. Rev.* **2001**, 101, 2209.
- [3] Jackson, M. D.; Denu, J. M. *Chem. Rev.* **2001**, 101, 2313.
- [4] Chen, Z.; Gibson, T. B.; Robinson, F.; Silvestro, L.; Pearson, G.; Bing-e, Xu; Wright, A.; Vanderbilt, C.; Cobb, M. H. *Chem. Rev.* **2001**, 101, 2449.
- [5] Cole, A.; Frame, S.; Cohen, P. *Biochem. J.* **2004**, 377, 249.
- [6] Fabian, J. R.; Daar, I. O.; Morrison, D. K. *Mol. Cell. Biol.* **1993**, 13, 7170.
- [7] Soling, H. D.; Fest, W.; Schmidt, T.; Esselmann, H.; Bachmann, V. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 10643.
- [8] Gullick, W. J.; Downward, J.; Waterfield, M. D. *EMBO J.* **1985**, 4, 2869.
- [9] Salomon, A. R.; Ficarro, S. B.; Brill, L. M.; Brinker, A.; Phung, Q. T.; Ericson, C.; Sauer, K.; Brock, A.; Horn, D. M.; Schultz, P. G.; Peters, E. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, 100, 443.

- [10] Zhou, H. L.; Watts, J. D.; Aebersold, R. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 375.
- [11] Mann, M.; Ong, S. E.; Gronborg, M.; Steen, H.; Jensen, O. N.; Pandey, A. *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 261.
- [12] Ojida, A.; Mito-oka, Y.; Inoue, M.; Hamachi, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2002** *124*, 6256.
- [13] Mandell, J. W. *Am. J. Pathol.* **2003**, 163, 1687.
- [14] Rush, J.; Moritz, A.; Lee, K. A.; Guo, A.; Goss, V. L.; Spek, E. J.; Zhang, H.; Zha, X. M.; Polakiewicz, R. D.; Comb, M. J. *Nat. Biotech.* **2005**, *23*, 94.
- [15] 佐渡 義一、生化学、**2001**, 73, 1163.
- [16] Neri, D.; Montigiani, S.; Kirkham, P. M. *Trends Biotechnol.* **1996**, *14*, 465.
- [17] Hagihara, M.; Fukuda, M.; Hasegawa, T.; Morii, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12932.
- [18] Tong, X.; Drapkin, R.; Yalamanchili, R.; Mosialos, G.; Kieff, E. *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *15*, 4735.
- [19] Yang, J.; Aittomaeki, S.; Pesu, M.; Carter, K.; Saarinen, J.; Kalkkinen, N.; Kieff, E.; Silvennoinen, O. *EMBO J.* **2002**, *21*, 4950.
- [20] Burgstaller, P.; Kochoyan, M.; Famulok, M. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 4769.
- [21] Geiger, A.; Burgstaller, P.; von der Eltz, H.; Roeder, A.; Famulok, M. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 1029.
- [22] Wilson, D. S.; Szostak, J. W. *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 611.
- [23] Breaker, R. R. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 371.
- [24] Osborne, S. E.; Ellington, A. D. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 349.
- [25] Joyce, G. F. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 791.
- [26] Geer, P.V.D.; Hunter, T. *Mol. Cell. Biol.* **1990**, *10*, 2991.
- [27] Ikeda, K.; Wang, L. H.; Torres, R.; Zhao, H.; Olasso, E.; Eng, F. J.; Labrador, P.; Klein, R.; Lovett, D.; Yancopoulos, G. D.; Friedman, S. L.; Lin, H. C. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 19206.
- [28] Donnelly, R. P.; Dickensheets, H. F.; Finbloom, D. S. *J. Interferon Cytokine Res.* **1999**, *6*, 563.
- [29] Nakazawa, T.; Komai, S.; Tezuka, T.; Hisatsune, C.; Umemori, H.; Semba, K.; Mishina, M.; Manabe, T.; Yamamoto, T. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 693.

- [30] Yokote, K.; Mori, S.; Hansen, K.; McGlades, J.; Pawson, T.; Heldin, C. H.; Claesson-Welsh, L. *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 15337.
- [31] Valiquette, M.; Parent, S.; Loisel, T. P.; Bouvier, M. *EMBO J.* **1995**, 14, 5542.
- [32] Futaki, S.; Suzuki, T.; Ohashi, W.; Yagami, T.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 5836.
- [33] Sui, G.; Soohoo, C.; Affar, E. B.; Gay, F.; Shi, Y.; Forrester, W. C.; Shi, Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, 5515.
- [34] Sawyer, D. A.; Potter, B. V. L. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1992**, 923-932.

第四章

蛍光性 RNA-ペプチド複合体の機能拡張法の開発

概要

蛍光性リボヌクレオペプチドセンサーの改良を目指し、ペプチドサブユニットの N 末端部位への蛍光分子の導入法を改良することによって、リボヌクレオペプチドセンサーの最適化を図った。蛍光性 ATP センサーは、リボヌクレオペプチドのペプチドサブユニットと蛍光分子の間にリンカー分子を挿入したり、ペプチドサブユニットと蛍光分子の結合部位の官能基を変えることによって、センサーとしての機能が向上した。本手法によって、蛍光性リボヌクレオペプチドセンサーの構築方法論が、より一般的な方法論として拡張されることが期待される。

4-1 緒言

in vitro セレクション法[1]によって構築される RNA あるいは DNA アプタマーは、優れた基質選択性と親和性を有するテラヌクレオチドリセプターとしてこれまで多数報告されている[2-5]。この核酸分子リセプターを基にした蛍光性バイオセンサーは、蛍光分子をリセプター分子に対して化学修飾することによりセンサーへ機能改変なされている[6-13]。第一章の序論で記述したように、核酸分子リセプターのヌクレオチド部位への直接的な蛍光分子の化学修飾では、特定の波長で応答する蛍光性センサーが常に作製できる保証がない。リセプターからセンサーへの機能改変の問題点として、蛍光応答を示す適切な蛍光分子の導入位置の予測が困難であることが挙げられる。

萩原ら[14]が開発した蛍光性リボヌクレオペプチドセンサーの作製法は、基質分子との結合に伴って、任意の検出波長と幅広い濃度応答領域と高い感度を有するバイオセンサーを構築する方法論である。蛍光性リボヌクレオペプチドセンサーの作製法は、RNA アプタマーのようにリセプター分子に対して蛍光分子を基質結合領域であるヌクレオチド部位に直接的に導入するセンサー作製法とは異なり、

蛍光分子の導入位置を選定せずに、蛍光センサーを作製できる理想的な方法論である。蛍光性 ATP センサーの作製法は、HIV Rev ペプチドとその標的配列である RRE RNA から構成される安定な RNA-ペプチド複合体[15]を基にした ATP 結合性リボヌクレオペプチドリセプター[16]の機能改変によって作製される。ATP 結合性リボヌクレオペプチドリセプターの RNA サブユニットと蛍光修飾 Rev ペプチドライブラリーを組み合わせる用いることによって、簡便に望みとする光学的特性を有するセンサーが選別できる[14]。

第四章では、リボヌクレオペプチドのペプチドサブユニットに、リンカー分子を介した蛍光分子の導入や蛍光分子とペプチドの共有結合の結合様式を変化させて、基質結合場の環境変化に鋭敏に反応する蛍光性バイオセンサーの作製を行った(図4-1)。

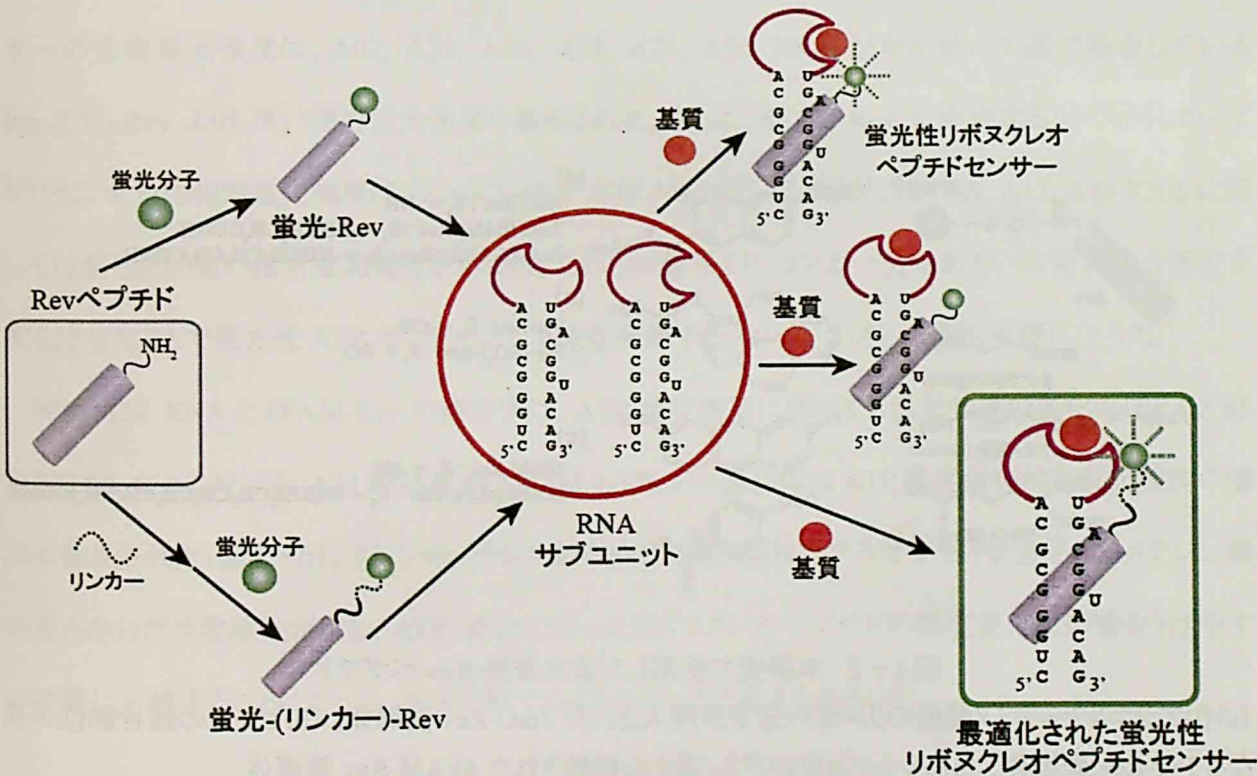


図4-1 蛍光性リボヌクレオペプチドセンサーの最適化の戦略図

(リボヌクレオペプチドリセプターの RNA サブユニットと蛍光修飾 Rev ペプチドとの組み合わせの中で、ペプチドサブユニットにリンカー分子が挿入された蛍光修飾ペプチドを用いることによって、基質結合場の環境変化に鋭敏に反応し発光するセンサーを選別する。)

4-2 結果と考察

4-2-1 蛍光修飾 Rev ペプチド誘導体の設計

一般的に微小な環境変化に対して蛍光分子は鋭敏である。蛍光分子の結合部位の位置を変化させたり、蛍光分子と Rev ペプチドの N 末端の間に適切な長さをもつリンカー分子を挿入することによって、リボヌクレオペプチドセンサーの蛍光応答性が調節可能になると考えられる。Rev ペプチドの N 末端に β -アラニンと γ -アミノ酪酸のリンカー分子が挿入されたクマリン修飾 Rev ペプチド [7mC-(β Ala)-Rev, 7mC-(GABA)-Rev] を作製した (図4-2)。また、ピレンスルホン酸クロライドを用いた合成によりスルホン基で共有結合している Pyr-(SO₂)-Rev の Pyr-(CO)-Rev の誘導体も作製した。さらに、リシン残基の ϵ 位のアミノ基からフルオレセイン分子を結合させた 6FAM-(ϵ Lys)-Rev の誘導体も作製した。

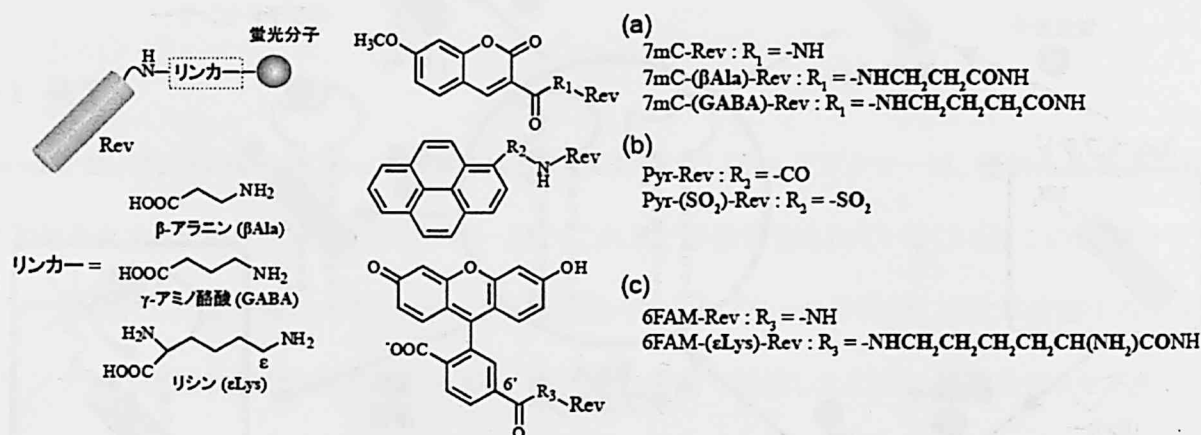


図4-2 本研究で使用した蛍光修飾 Rev ペプチド

(a) β -アラニンと γ -アミノ酪酸のリンカー分子が挿入された 7mC-Rev 誘導体、(b) ピレンの結合部位が異なる Pyr-Rev 誘導体、(c) リシンの ϵ 位のアミノ基から修飾された 6FAM-Rev 誘導体

4-2-2 蛍光性 ATP センサーの最適化

リンカー分子や共有結合部位が異なる蛍光修飾 Rev を用いて、蛍光性 ATP センサーのスクリーニングを行った。蛍光修飾した各々の Rev ペプチドと RNA を複合体形成させて、96 穴のプレートの溝の中に独立的に基質分子 ATP を含む混合溶液を入れて蛍光強度の測定を行った。使用した RNA は、萩原ら[14]が開発した蛍光性 ATP センサーの構築で使った RNA を用いた(図4-3)。0.1 mM ATP 存在下・非存在下の蛍光強度をマイクロプレートリーダーを用いて測定した。蛍光性リボヌクレオペプチドと ATP 存在下での蛍光強度(I)、蛍光性リボヌクレオペプチドと ATP 非存在下での蛍光強度(I_0)とした相対的蛍光強度(I/I_0)を、7mC-Rev 誘導体と Pyr-Rev 誘導体は 390 nm の発光波長で測定し、6FAM-Rev 誘導体は 535 nm で検出した(図4-4)。

7mC-(βAla)-Rev と A6, A24, A28, A35 RNA の各リボヌクレオペプチドは、β-アラニンを介することで相対蛍光強度の増加が顕著に認められた。また、Pyr-(SO₂)-Rev に由来するリボヌクレオペプチドセンサーの相対蛍光強度は、A02, A25, A26, A28, A34, A35 RNA がカルボニル基で結合している Pyr-(CO)-Rev よりも高い相対蛍光強度を観測された。さらに、6FAM-Rev に由来するリボヌクレオペプチドセンサーの相対蛍光強度は、リシンリンカーが挿入されているほうが、A6, A9, A17, A24 RNA に関しては明らかに高い相対蛍光強度を示した。これらの結果より、リンカー分子あるいは共有結合部位を変化させたことで蛍光性 ATP センサーとして機能発揮するクローンがさらに選別可能になった。

特に A24 RNA と 6FAM-Rev の複合体は、ATP 濃度増加に伴っても蛍光強度の変化がほとんど認められないことに対して、A24 RNA と 6FAM-(εLys)-Rev の複合体は ATP 濃度依存的な蛍光強度の増加が観測された(図4-5)。リシンのメチレン鎖を介して導入されたフルオレセイン分子は、メチレン鎖の長さの分だけ柔軟性が増し、ATP 結合に伴ったリボヌクレオペプチドの環境変化に影響を受けやすい位置に近接することによって、蛍光を発するようになったと考えられる。

	RRE 配列		基質結合領域			RRE 配列	
A01	GGUCUGGGCGCA	CCUUC	GUAGUGG	UGUUGUG	UGUG	GUUGUUG	UGACGGUACAGGCC
A09	-----	CUGGUGU	GUAGUGG	GCUGUG	UGUG	AUGCCG	-----
A14	-----	UACUGC	GUAGUGG	UUGGUG	UGUG	GCGGUUU	-----
A15	-----	GCAGU	GUAGUGG	UUUGCG	UGUG	AUUGCUUA	-----
A17	-----	UUAGAU	GUAGUGG	GUAGUG	UGUG	UUUUCUG	-----
A21	-----	UUUGC	GUAGUGG	UUUUUGUG	UGUG	GCUGUA	-----
A23	-----	UUAGAC	GUAGUGG	UUUUGUG	UGUG	GUCUGC	-----
A24	-----	UGAUUGC	GUAGUGG	UUUGUG	UGUG	GUUGUC	-----
A25	-----	UGCUG	GUAGUGG	GUAUGUG	UGUG	CGGCAUU	-----
A26	-----	UUCCG	GUAGUGG	UUGUGUG	UGUG	CGGUUUU	-----
A30	-----	UAUACC	GUAGUGG	UUUGUG	UGUG	GGUUGG	-----
A31	-----	CAGAUU	GUAGUGG	CUUUUUGUG	UGUG	AAUC	-----
A32	-----	UUGUAU	GUAGUGG	AUAUGUG	UGUG	AUGCCG	-----
A33	-----	GUUUGCUGUUGCCGU	GUAGUGG	UUUG	UGUG		-----
A34	-----	U	GUAGUGG	UGCC	UGUG	AUGGCUGUGUGUGA	-----
A35	-----	UCUUCU	GUAGUGG	UUUGCG	UGUG	AGUUGUG	-----
A02	-----	UUGCAU	GUUGUGG	GUAUGUG	UGUG	AUGUAU	-----
A08	-----	UUUUCAUGGCC	CUUGUGG	GAAGGAU	UGUG	A	-----
A16	-----	UUGGCAC	GAAGUGG	UUUG	UGUG	UGGUGUUU	-----
A36	-----		GUGGUGG	UUCG	UGUG	GGUGCGCUGGUUUUGU	-----
A29	-----		GUGG	UUGGUGGUC	UGUC	GGGACGUGCUUGC	-----
A04	-----	AGGGCUUGGUGUGCCGAUUUCGGGGCAUU					-----
A28	-----	AGGGCUUGGUGUGCCGAUUUCGGGGCAUUU					-----
A05	-----	UUUCUCAGGUUUUGUACUGUGCGUUGUCCAU					-----
A06	-----	GUGUGGGUGGAAAGUAACUGGCGUUUUUGUG					-----
A07	-----	GAUGCUUGCCGUUUGUCAUGGUGUGGAGAG					-----
A11	-----	UAGGGAUGUUGUGCGCACUUUGUGUCUCUU					-----
A18	-----	AUUGGUCUUGUCUCGAUUUGGCGCUUCGCG					-----
A22	-----	CUGUUUUGGCUUUACCGUUGUGGAACCCGU					-----

図4-3 ATP に対して親和性を有するリボヌクレオペプチドライブラリーのランダム領域の RNA 配列 (青色で示すのは保存配列)

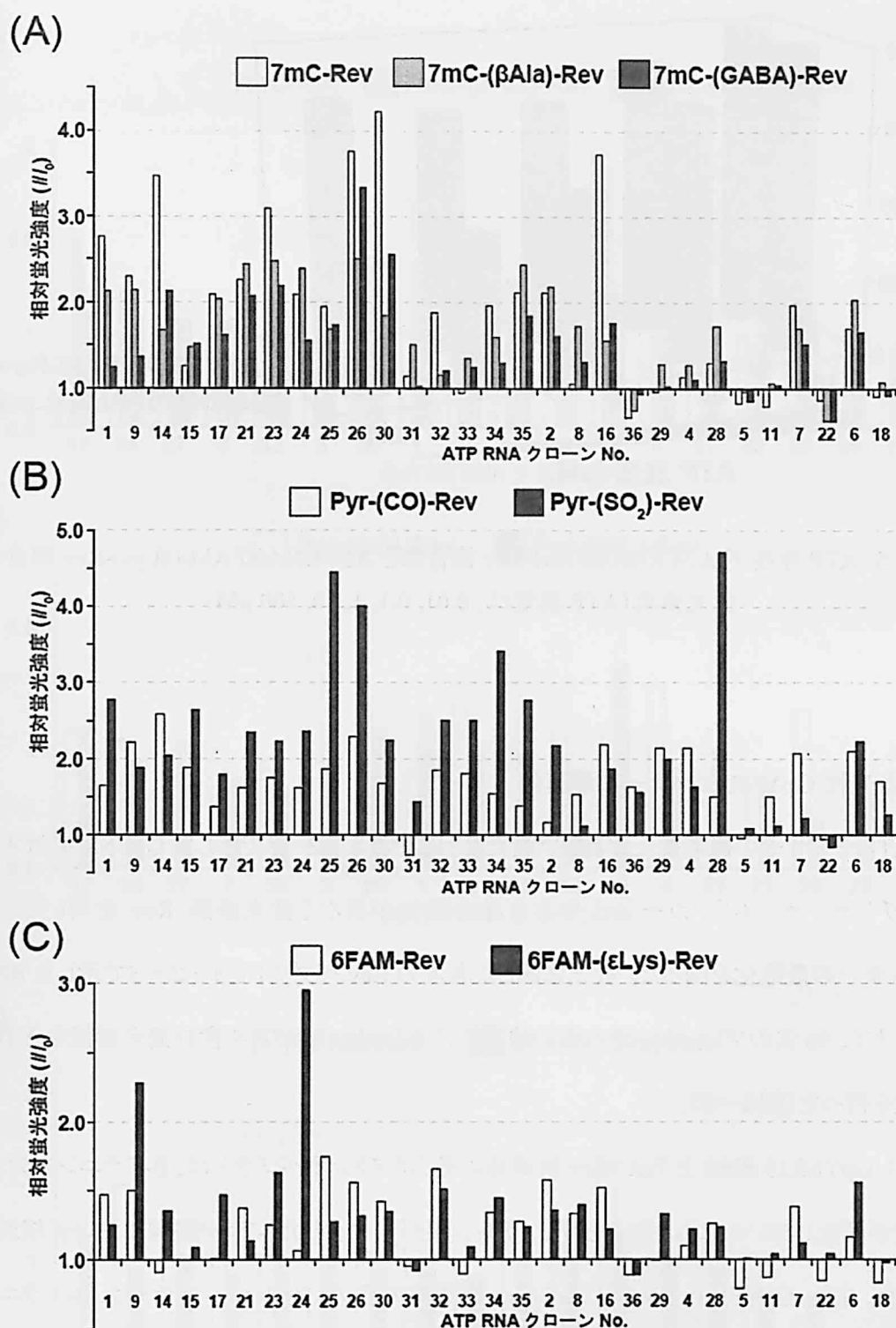


図4-4 0.1 mM ATP 存在下での(A)7mC-Rev(白棒)、7mC-(β Ala)-Rev(灰棒)、7mC-(GABA)-Rev(黒棒) (B)Pyr-(CO)-Rev(白棒)、Pyr-(SO₂)-Rev(黒棒) (C)6FAM-Rev(白棒)、6FAM-(ϵ Lys)-Rev(黒棒)と各 ATP RNA クローン複合体の相対蛍光強度の比較

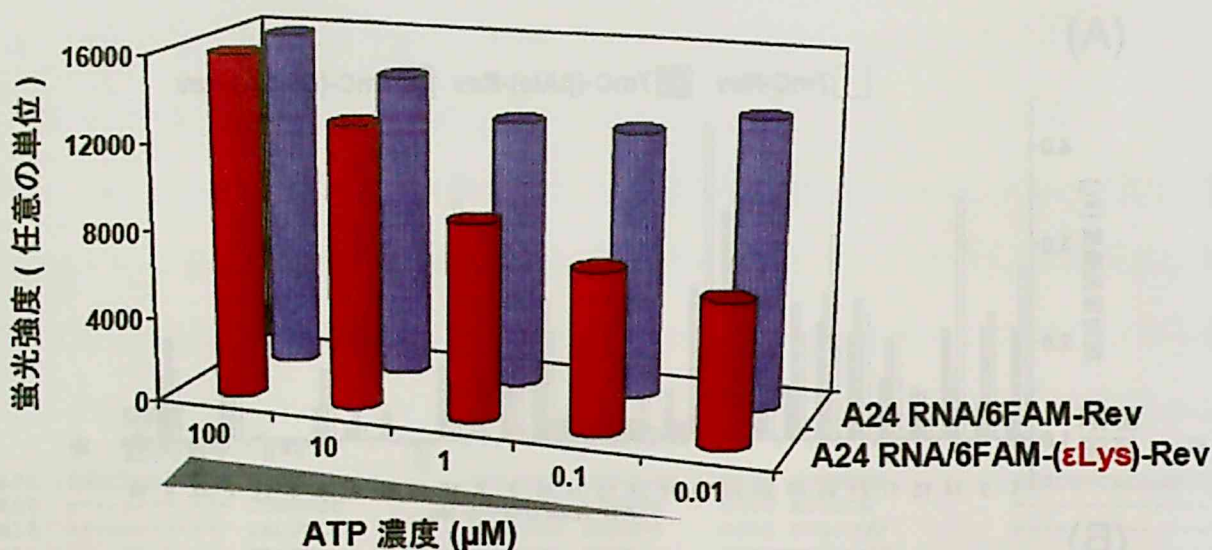


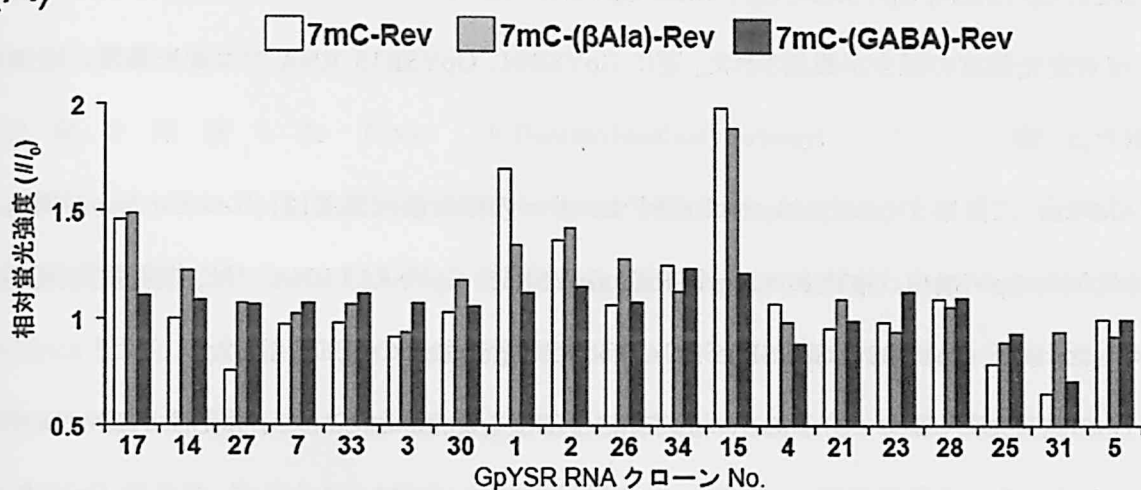
図4-5 ATP 存在下 A24 RNA/6FAM-Rev 複合体と A24 RNA/6FAM-(εLys)-Rev 複合の
蛍光強度 (ATP 濃度は、0.01, 0.1, 1, 10, 100 μM)

4-2-3 蛍光性 GpYSR センサーの最適化

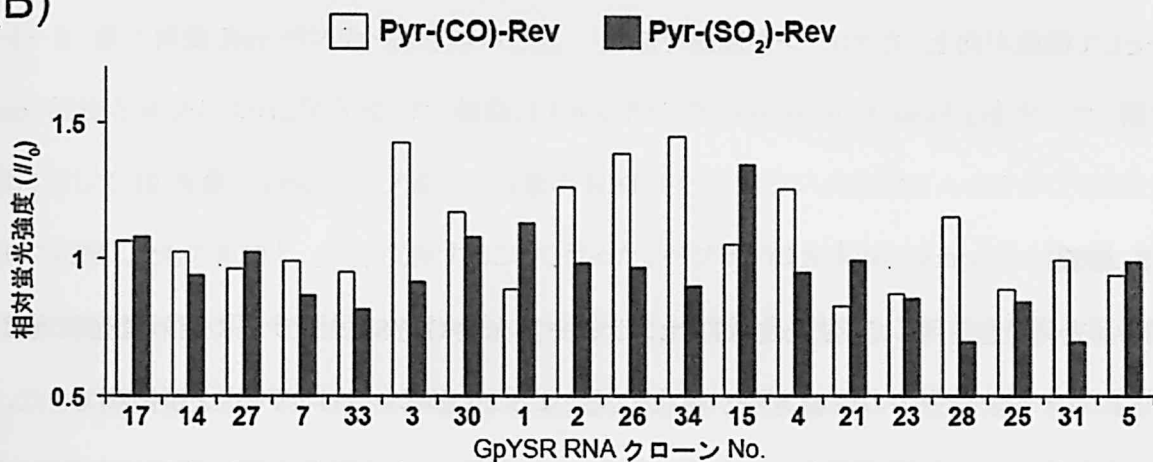
蛍光性 ATP センサーの機能向上が確認できたことにより、3-2-7で示した GpYSR に対するリボヌクレオペプチドセンサーもリンカー分子や共有結合部位が異なる蛍光修飾 Rev を用いて、蛍光性 GpYSR センサーの最適化を図った。蛍光修飾した各々の Rev ペプチドと3-2-3で示した RNA を複合体形成させて、96 穴のプレートの溝の中に独立的に 0.5 mM GpYSR を含む混合溶液を入れて蛍光強度の測定を行った(図4-6)。

GpYSR17, GpYSR15 RNA と 7mC-Rev 誘導体の各リボヌクレオペプチドは、β-アラニンを介しても相対蛍光強度が変化しないのにもかかわらず、メチレン鎖が 1 つ介したγ-アミノ酪酸において相対蛍光強度が減少した。また、GpYSR01 RNA と 7mC-Rev 誘導体の各リボヌクレオペプチドは、β-アラニン、γ-アミノ酪酸とメチレン鎖が増えることで相対蛍光強度が減少した。

(A)



(B)



(C)

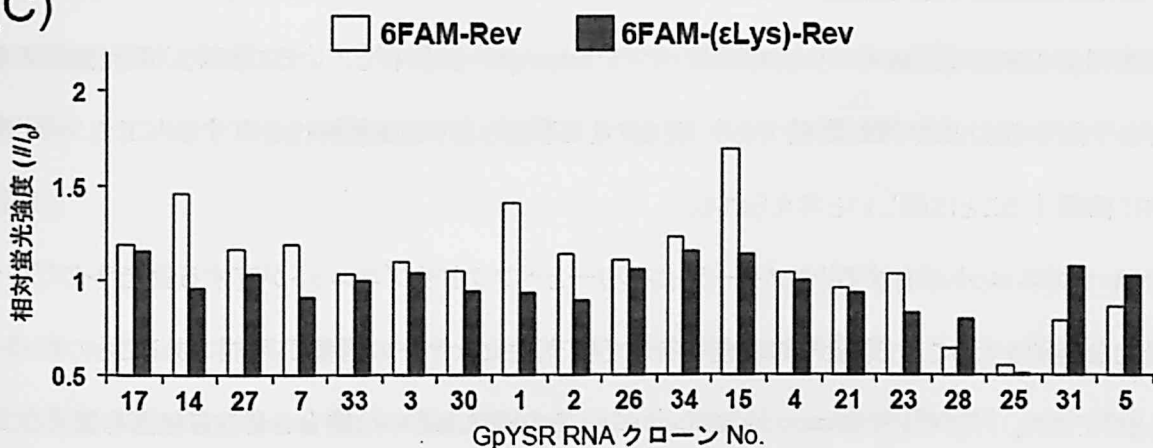


図4-6 0.5 mM GpYSR 存在下での (A) 7mC-Rev (白棒)、7mC-(bAla)-Rev (灰棒)、7mC-(GABA)-Rev (黒棒) (B) Pyr-(CO)-Rev (白棒)、Pyr-(SO₂)-Rev (黒棒) (C) 6FAM-Rev (白棒)、6FAM-(εLys)-Rev (黒棒) と各 GpYSR RNA クローン複合体の相対蛍光強度の比較

Pyr-(SO₂)-Rev に由来するリボヌクレオペプチドセンサーの相対蛍光強度は、GpYSR03, GpYSR02, GpYSR26, GpYSR34, GpYSR04, GpYSR28, GpYSR31 RNA がカルボニル基で結合している Pyr-Rev よりも相対蛍光強度の減少が観測された。逆に GpYSR01, GpYSR15 RNA では蛍光強度の増加が観測された。

6FAM-Rev に由来するリボヌクレオペプチドセンサーの相対蛍光強度は、リシンリンカーが挿入されているほうが、GpYSR14, GpYSR01, GpYSR02, GpYSR15, GpYSR23 RNA では、相対蛍光強度の減少が示した。また、GpYSR31, GpYSR05 RNA では相対蛍光強度の増加を示した。

これらの結果より、リンカー分子あるいは共有結合部位を変化させたことで、蛍光性 ATP センサーと比較して、センサーの機能が向上したクローンの数は少なかったにもかかわらず、蛍光性 GpYSR センサーとして機能が向上したクローンが確認できた。

4-3 結論

同じ蛍光分子を使用しても蛍光性 ATP センサーや蛍光性 GpYSR センサーの相対蛍光強度は、ペプチドに対する蛍光分子の修飾方法が異なることによって、影響を受けていることが観測できた。Rev ペプチドに蛍光分子を共有結合で修飾させるときに、リンカー分子を挿入したり、共有結合させる官能基を変えることによって、蛍光修飾 Rev ペプチドライブラリーの多様性が増した。ATP 結合に伴った蛍光強度の変化割合は、個々のリボヌクレオペプチドセンサーに依存していることから、蛍光強度の変化割合を予測することは非常に困難であり、現在のところ望みとする蛍光特性を有する人工センサーを理論的に構築することは難しいと考えられる。

RNA サブユニットが有するリセプターライブラリーとペプチドサブユニットが有する蛍光ライブラリーを網羅的な選別を行うことで、望みの機能を有する蛍光性センサーの構築が可能であることの利点を示すことができた。ペプチドサブユニットにリンカー分子の導入あるいは結合させる官能基を変えることでリボヌクレオペプチドセンサーの最適化が可能であることを示すと共にリボヌクレオペプチドセンサーの作製法が拡張可能であることを確立した。

4-4 実験の部

4-4-1 試薬

側鎖を保護した Fmoc (9-fluorenylmethoxycarbonyl) アミノ酸と HBTU ((2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate))とペプチド合成用 DMF は渡辺化学工業社から、Fmoc-PAL-PEG 樹脂は Applied Biosystems 社から 1-pyrenecarboxylic acid は Aldrich 社から、Pyr-SO₂-Cl (pyrenesulfonyl chloride)と 7mC (7-methoxycoumarin-3-carboxylic acid) と 6FAM (6-carboxyfluorescein, succinimidyl ester)は Molecular Probes 社から購入した。

4-4-2 蛍光修飾 Rev ペプチド誘導体の合成

Fmoc 固相合成法により化学合成した。樹脂は Fmoc-PAL-PEG resin (0.38 mmol/g)を用いた。縮合は、樹脂に対して 10 当量の Fmoc アミノ酸、10 当量の HBTU を 5 %のジイソプロピルエチルアミンを含む DMF に溶解したものを加え、60 分攪拌することで行った。ペプチドの N 末端の Fmoc 基を除去した後、2 当量の蛍光分子を用いて活性エステル法にて合成した。樹脂からの切り出しおよび側鎖の脱保護は、フェノール(0.75 g)、チオアニソール(0.5 mL)、エタンジチオール(0.25 mL)、蒸留水(0.5 mL)、トリフルオロ酢酸(10 mL)の混合溶液を、氷上乾燥させた樹脂に加え、3 時間攪拌した。反応終了後、樹脂をろ別し、エーテル沈殿により Rev ペプチドを回収した。沈殿を水に溶解させ、エーテルによる洗浄後、10 %酢酸水溶液を溶離液としてゲルろ過(Sephadex G-10)精製を行った後、逆相 HPLC により精製した(溶離液 A 0.2 %トリフルオロ酢酸水溶液、溶離液 B 0.2 %トリフルオロ酢酸を含む 50 %アセトニトリル水溶液)。

4-4-3 リボヌクレオペプチドセンサーの 96 穴プレートを用いた蛍光測定

蛍光測定は、Perkin Elmer 社 Wallac ARVOsx 1420 multilabel counter を用いて行った。測定に使用した RNA は、塩濃度 10 mM Tris (pH 7.6), 100 mM NaCl 存在下で 80°C, 3 分放置後、4°C に急冷させてから使用した。測定溶液 100 μ L 中には、ATP 存在下では 0.1 mM となるようにし、1 μ M RNA, 1 μ M 蛍光修飾 Rev 存在下で終塩濃度は、10 mM Tris-HCl(pH 7.6), 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ に

て測定した。プレートに試料溶液を加えた後、Wallac ARVOsx 1420 multilabel counterで1分間の攪拌後、20℃で30分間静置してから各蛍光分子に適した波長で蛍光強度を測定した。7mC-RevとPyr-Rev誘導体は350 nmの波長で励起し、390 nmの発光波長を測定した。6FAM-Rev誘導体は485 nmの波長で励起し、535 nmの発光波長を測定した。

引用文献

- [1] Ellington, A. D.; Szostak, J. W. *Nature* **1990**, *346*, 818.
- [2] Wilson, D. S.; Szostak, J. W. *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 611.
- [3] Breaker, R. R. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 371.
- [4] Osborne, S. E.; Ellington, A. D. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 349.
- [5] Joyce, G. F. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 791.
- [6] Jayasena, S. D. *Clin. Chem.* **1999**, *45*, 1628.
- [7] Llano-Sotelo, B.; Chow, C. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 213.
- [8] Stojanovic, M. N.; de Prada, P.; Landry, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11547.
- [9] Jhaveri, S. D.; Kirby, R.; Conrad, R.; Maglott, E. J.; Bowser, M.; Kennedy, R. T.; Glick, G.; Ellington, A. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2469.
- [10] Yamana, K.; Ohtani, Y.; Nakano, H.; Saito, I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3429.
- [11] Nutiu, R.; Li, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4771.
- [12] Ho, H. A.; Leclerc, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1384.
- [13] Merino, E. J.; Weeks, K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12766.
- [14] Hagihara, M.; Fukuda, M.; Hasegawa, T.; Morii, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12932.
- [15] Battiste, J. L.; Mao, H.; Rao, N. S.; Tan, R.; Muhandiram, D. R.; Kay, L. E.; Frankel, A. D.; Williamson, J. R. *Science* **1996**, *273*, 1547.
- [16] Morii, T.; Hagihara, M.; Sato, S.; Makino, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4617.

第五章

生理活性分子ドーパミンに応答する蛍光性 RNA-ペプチド複合体の創製

概要

生体中の循環器系、神経系、泌尿器系などの器官で生体反応を制御するドーパミンは、生体内の神経伝達物質として着目されている。脳細胞外体液中のドーパミン濃度の低下とパーキンソン病が密接に関わることが最近明らかになってきており、ドーパミン及びその代謝産物の検出は、神経性疾患の解明において極めて重要である。蛍光性リボヌクレオペプチドセンサーの作製法を基に、簡便かつ迅速にドーパミンを高感度に定量できる蛍光性ドーパミンセンサーを作製した。

5-1 緒言

ドーパミンは、神経伝達物質(活動電位を神経細胞から神経細胞へと伝える化学物質:図5-1)であり、運動調節、ホルモン調節、動機付け、快の感情、意欲、学習などに関わる。脳の細胞外体液中のドーパミン濃度が減少するとパーキンソン病が発症し、逆にドーパミン濃度が増加すると幻覚やパラノイア(精神分裂病の陽性症状)を発症することが報告されている[1, 2]。チロシン誘導体であるドーパミン、ノルエピネフリン、エピネフリンの3つの物質は、総称してカテコールアミンと呼ばれており、脳、副腎髄質および交感神経に存在する(図5-2)。ドーパミンの代謝産物であるノルエピネフリンは、交感神経系の重要な神経伝達物質であり、脳に存在する。また、ノルエピネフリンの代謝産物であるエピネフリンは、血糖値が下がったとき、運動をしたとき、様々な種類の強いストレスを感じたときなどに、副腎の髄質から分泌される。エピネフリンには、肝臓中のグリコーゲンを分解してグルコースに変える、脂肪組織からの脂肪酸の遊離を促す、筋組織の中の小動脈を拡張させる、心臓の鼓動を速く・力強くするなどの多様な生理的機能がある[3]。上記のように、ドーパミンだけが生理活性を調節する物質ではなく、ドーパミン以外のカテコールアミンも生理活性を調節する重要な物質である。

ドーパミンの前駆体はL-ドーパで、チロシンがチロシン水酸化酵素によってL-ドーパになり、L-ドーパ

がドーパ脱炭酸酵素の働きでドーパミンが生成する[4]。ドーパミンはノルエピネフリンの前駆体であり、ドーパミンはドーパミンβ水酸化酵素によってノルエピネフリンになることが明らかにされている。分子構造が類似するこれら重要な生理活性を担うシグナル分子を網羅的に検出できるバイオセンサーの技術開発が必要とされている[5, 6]。

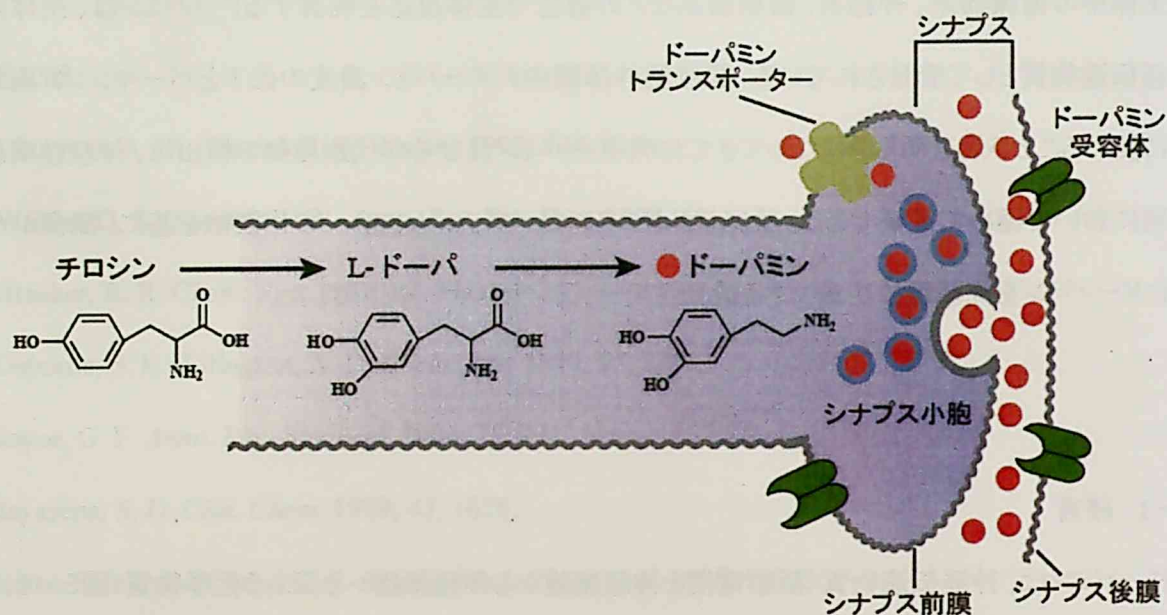


図5-1 神経シナプスにおけるドーパミンの代謝の模式図

(軸索内を神経終末へ向かって軸索流によって移動しながら、チロシンから出発してドーパミンへ生合成される。)

カテコールアミンは、励起波長280 nm付近で励起すると330 nm付近に微弱な蛍光を発する。280 nm付近の吸収波長もつチロシンなどは生体内においてカテコールアミンの数倍以上存在することから、カテコールアミン自身の蛍光で検出することは困難である[4]。また、血中のカテコールアミン濃度は1 mL血しよあたりpmolオーダー以下と非常に微量であるため、これまでの分析法で用いられている電気化学検出法や蛍光検出法の感度では、血液を1 mL以上を必要になる[7]。一般的なカテコールアミンの定量法として、カテコールアミンを化学反応によって、蛍光の発光強度の強い物質に変換することによって定量が行われている。エチレンジアミン法(図5-3)とトリヒドロキシインドール法(図5-4)の二つの定量法が汎用されている[8, 9]。

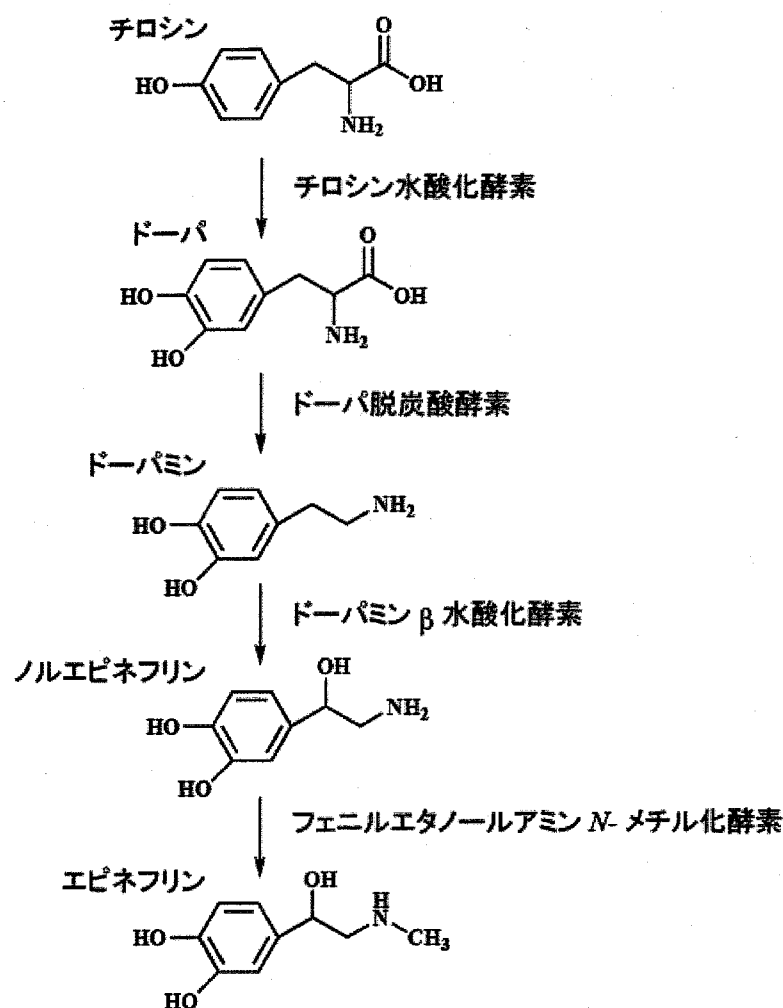


図5-2 カテコールアミンの生合成経路

エチレンジアミン法は、カテコールアミンをエチレンジアミンと縮合させ、縮合した化合物の蛍光を測定する方法である。トリヒドロキシインドール法は、カテコールアミンを酸化させてトリヒドロキシインドール体として、強アルカリ中で強力な蛍光を発する方法である。酸化剤としては、二酸化マンガ、フェリシアン化カリウム、ヨウ素試薬などが一般的に用いられている。どちらの化学反応を利用した発光による定量方法も、カテコールアミン類すべてに反応することに難点があり、予めカテコールアミン類を分離する煩雑な操作が必要である。

2004年にクマリン分子の誘導体を基にしたドーパミンに対する人工センサーが報告された[10]。有機低分子を基にした人工センサーは、ドーパミンに対する平衡解離定数が294 μM であり、ノルエピネフリン

ンに対する平衡解離定数が $153\ \mu\text{M}$ であった。人工センサーのアルデヒド基とドーパミンのアミノ基とのイミニウムイオン形成と、人工センサーのボロン酸とドーパミンのカテコール部位とのボロン酸エステル形成を原理とした人工センサーは、カテコールアミン類を選択的に識別することは困難である。

一方、*in vitro*セレクション法を用いてドーパミンに対するRNAアプタマーが報告されている[11]。ドーパミンを特異的に認識するRNAアプタマーは、平衡解離定数が $1.6\ \mu\text{M}$ で高い親和性を有し、カテコールアミン類を高選択的に識別できる有用な人工リセプターであるが、この核酸分子リセプターを基にしたセンサーは、2006年時点までに報告されていない。

このような観点から、臨床的にも容易に応用可能な簡便かつ高感度のカテコールアミン定量法が望まれている。第五章では、蛍光性リボヌクレオペプチドセンサーの作製法を基に、簡便かつ迅速にドーパミンを定量できる蛍光性ドーパミンセンサーの作製を行った。

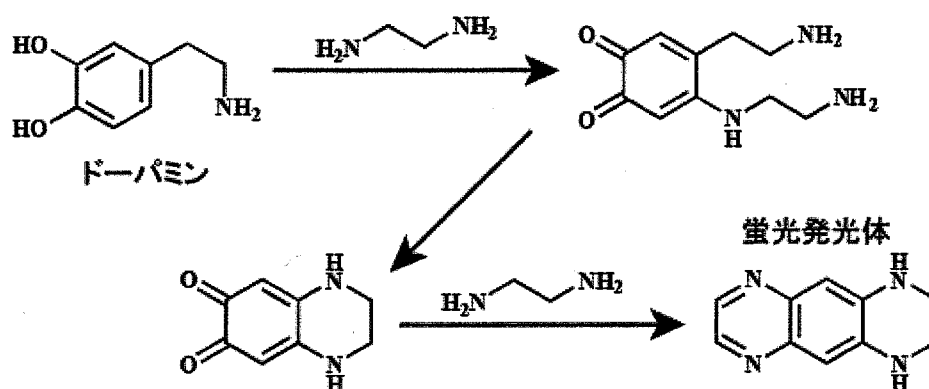


図5-3 エチレンジアミン法

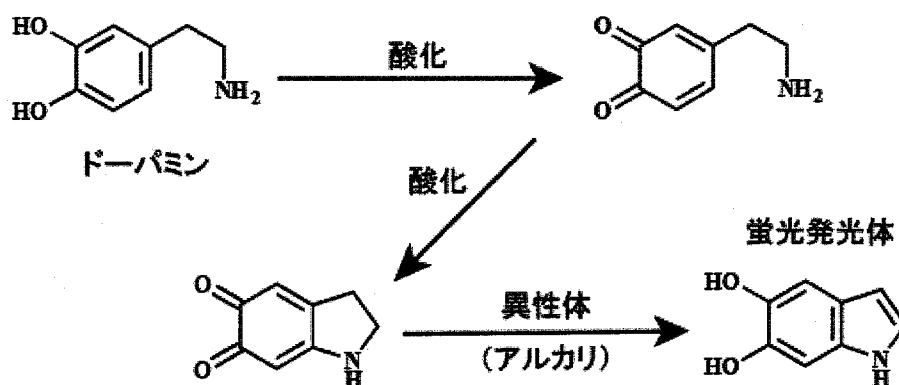


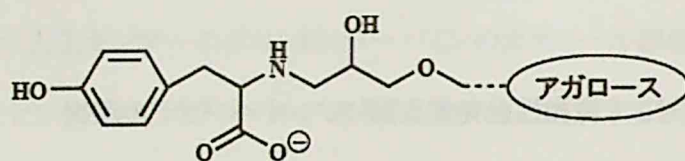
図5-4 トリヒドロキシインドール法

5-2 結果と考察

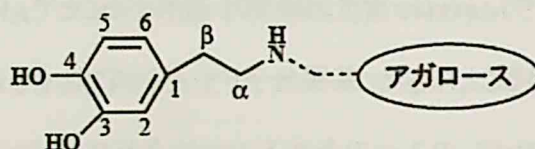
5-2-1 ドーパミンに対して親和性を有するリボヌクレオペプチドの選択

ドーパミンアガロース樹脂(図5-5)に対して、ランダムな7塩基長から40塩基長を有するリボヌクレオペプチドライブラリーを用いて、*in vitro* セクション法を適用することで、ドーパミンに対して親和性を有するリボヌクレオペプチドを得ることとした。基質分子ドーパミンに対する選択の過程において、塩濃度を150 mM NaClと300 mM NaClの2つの条件下での結合反応を行うことで選択を行った。核酸はアニオンであり、用いた Rev ペプチドは正電荷を帯びていることから、塩濃度を上昇させることで静電相互作用の反発により複合体形成反応が不利になる。300 mM NaClの条件下での選択において、基質に対して親和性の低いリボヌクレオペプチドは、150 mM NaClよりも300 mM NaClの条件下の方がより排除されることが期待できる。また選択時には、リボヌクレオペプチドライブラリーをチロシンアガロース樹脂(図5-5)に対して結合させて、チロシンに結合するリボヌクレオペプチドを取り除く選択圧も加えた。

リボヌクレオペプチドライブラリーは、ランダムな7塩基長から40塩基長を有するDNAライブラリーを基にして、T7 RNAポリメラーゼを用いた転写反応によりRNAライブラリーに変換後、Revの添加によって作製した(第三章章末の実験の部を参照)。作製したリボヌクレオペプチドライブラリーは、塩濃度を150 mM NaClと300 mM NaClの2つの条件下で、チロシンアガロース樹脂に結合させた。チロシンアガロース樹脂をとおすことで、ドーパミンの α 位のカルボン酸を認識し、ドーパミンの3位水酸基を認識しないリボヌクレオペプチドを排除した。チロシンアガロース樹脂に対して素通りした画分をドーパミンアガロース樹脂に加え、30分間の結合反応後、樹脂を十分に洗浄することで非特異的に結合しているリボヌクレオペプチドの画分を除去した。ドーパミンアガロース樹脂に結合したリボヌクレオペプチド画分は、ドーパミンにより特異的に溶出した。溶出されたRNAは逆転写酵素によりDNAに変換し、PCRにより増幅した。この逆転写反応、PCRの過程で、ドーパミン結合活性が高められたDNAライブラリーが作製され、転写された新たなRNAライブラリーは選択する前のRNAライブラリーに比べ、ドーパミンに対して結合活性が高められた分子種が濃縮されていると考えられる。このようにして、選択、増幅のサイクルを繰り返す行することで、ドーパミンに高い親和性で結合するリボヌクレオペプチドを選択した。



チロシンアガロース樹脂

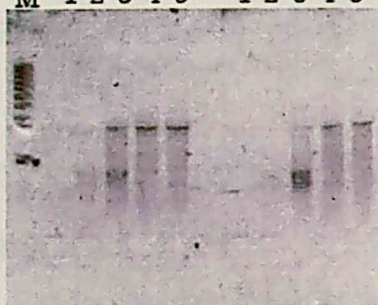


ドーパミンアガロース樹脂

図5-5 選択に使用したアガロース樹脂の構造

(A)

150 mM NaCl					300 mM NaCl					
M	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5



M: 分子量マーカー (100 塩基から 1000 塩基)

1: 5 サイクル目の増幅 DNA

2: 10 サイクル目の増幅 DNA

3: 15 サイクル目の増幅 DNA

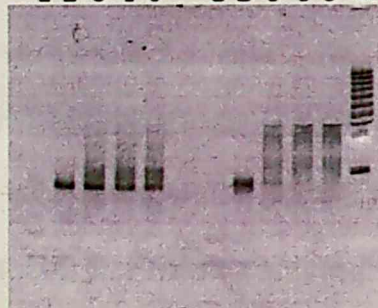
4: 20 サイクル目の増幅 DNA

5: 25 サイクル目の増幅 DNA

1 ラウンド目

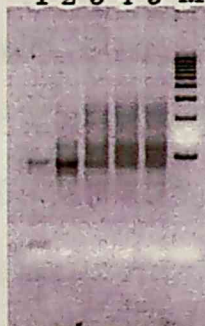
(B)

150 mM NaCl					300 mM NaCl					
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	M



12 ラウンド目

300 mM NaCl					
1	2	3	4	5	M



14 ラウンド目

M: 分子量マーカー (100 塩基から 1000 塩基)

1: 4 サイクル目の増幅 DNA

2: 8 サイクル目の増幅 DNA

3: 12 サイクル目の増幅 DNA

4: 16 サイクル目の増幅 DNA

5: 20 サイクル目の増幅 DNA

図5-6 PCR による DNA 増幅の確認泳動写真

(A) 1 ラウンド目における各 PCR サイクル数の DNA 増幅泳動写真

(B) 12, 14 ラウンド目における各 PCR サイクル数の DNA 増幅泳動写真

150 mM NaCl の条件下で 12 回の選択・増幅を繰り返した後に、1 ラウンド目の DNA プールと 12 回目の DNA プールの PCR 増幅サイクル(図5-6)を観察すると、サイクル数が短くなっていたことから RNA の配列解析を行った。選択時の結合分子種が増えることによって、PCR 増幅の鋳型 DNA 量が増え、サイクル数が短くなったと考えられる。同様に 300 mM NaCl の条件下では、14 回の選択・増幅を繰り返した後に RNA の配列解析を行った。

150 mM NaCl の条件下でドーパミンに対して 12 回の選択・増幅を繰り返して得られた RNA 配列(図5-7)は、29 クローン中 14 個の同一配列を有する DL02 クローンが認められた。DL02 は 13 塩基の高度な保存配列 5'-CCUAUACUG---ACGU-3'を有していた。また基質結合領域の塩基長も 19 から 26 塩基長のクローンが多く認められたが、DL29 だけが 37 塩基長を有していた。

300 mM NaCl の条件下でドーパミンに対して 14 回の選択・増幅を繰り返して得られた RNA 配列(図5-8)は、27 クローン中 6 個の同一配列を有する DH05 クローンと 27 クローン中 2 個の同一配列を有する DH22 が認められた。DH05 と DH22 は、UGAA という共通配列が認められたが、全体的な配列としてほとんど相同性が認められなかった。また、150 mM NaCl の条件下とは異なり、基質結合領域の塩基長が 30 塩基長以上のクローンが多かった。塩濃度を上げた選択圧をかけることで、リボヌクレオペプチドのドーパミンに対する基質結合場は、異なる相互作用様式で形成されていることが示唆された。

DL02 : GUA **CCUAUACUG** **ACGU** CUUUU (14)
 DL24 : GUA **CCUAUACUG** **ACGU** CUUGU
 DL03 : GUA **CCUAUACUG** **ACGU** UCUUG
 DL28 : GUA **CCUAUACUG** **ACGU** UCAUA
 DL11 : GUA **CCUAUACUG** **ACGU** UCAUG
 DL01 : **CCUAUGCUG** CUGU CCAAUUG
 DL14 : GCCAGCCUU **ACGU** UCGCUAG
 DL31 : AUGCGGCGACCC **ACGU** CUCCUGUGUU

 DL26 : UGUUGUGUGCCCCUUGCU **GUUG**
 DL19 : UUACUUUGC **GUUG** CACUUG
 DL29 : AUCUGUGUAAGCUGUUGCACCG **GUUG** UAAGUAAAACU
 DL23 : UCCUCUAGCGAAGGAU **GUUG** UCGAACG
 DL22 : GUA **UUUUA** CUGCCCUC **GUUG**
 DL07 : UUAU **UUUUA** UAAUGUGUAUUACAUC
 DL12 : AGCC **UUUUA** AUCGU
 DL27 : GCAUAUGACGCCUACUU

図5-7 150 mM NaCl の条件下で 12 回の選択後における RNA サブユニットにランダム領域が
 7 から 40 塩基長のリボヌクレオペプチドライブラリーの RNA 配列
 (括弧内に示す数字は同じ配列をもつコロニー数、緑と青色で示すのは保存配列)

DH05 : **CACA** UAUUGGUUUCAAUAUGGGC **UGAA** AUU (6)
 DH15 : GGC **CACA** CUGACCUCGUCAUUGGGU **UGAA** AUGUU
 DH17 : UGUC **CACA** CCAUGCUCUGUGGGG **UGAA** AUUGAUC
 DH24 : AUG **CAGA** CCGUGGUCCCCUUAGUGUUGC **GAA** UUUC
 DH30 : AUG **CAGA** CCGUGGUCCCCUUAGUGUUGC **GAA** UUGC
 DH22 : AAUUGGC **UCGU** UUGCGGCCAGGAU **UGAA** AU (2)
 DH36 : AAUUGGC **UCGU** UUGCGGCCAGGAU **UGAA** GU
 DH13 : GAUGGG **UGCG** CU **UGAA** CUAUGAAUCU
 DH18 : UUUCGAUA **UGCG** U **UGAA** UUUUUACAUAAC
 DH19 : UUU **UGCG** AGUCGGC **UGGA** CAUU
 DH33 : AAUUGG **UCGU** GUUGCCGGGUCUGAGGGUCCCCAUC
 DH06 : AGCA **UCGU** AUUUUUAUGGCUUUA
 DH20 : UGAU **UCGU** GCUAGCCUGUUAGAAUAAUUUUGGCCACA
 DH31 : GACUCUUAGUCGGU **UGAA** AUCGCUCCGCUGCCU
 DH04 : AGCAUCAGUUUCCGCUGGCCUCAA
 DH07 : UUGCACCCGUUUACGCGCUUU
 DH34 : AUAGGGUUGAAACUCCGCCUUAAGGACAUUUU
 DH35 : UGUCCAGCUGCCAGGCUUACCACCGGGCAAAGAUGCG
 DH09 : GUACCUAUACUGACGUCUGAUG
 DH12 : GGUGGGUUCUAAGCCCAGCGUCCGGCUCUGUGU

図5-8 300 mM NaCl の条件下で 14 回の選択後における RNA サブユニットにランダム領域が
 7 から 40 塩基長のリボヌクレオペプチドライブラリーの RNA 配列
 (括弧内に示す数字は同じ配列をもつコロニー数、太字で示すのは保存配列)

5-2-2 ドーパミン結合性リボヌクレオペプチドセンサーの選別

蛍光修飾ペプチドを用いたリボヌクレオペプチドセンサーの選別において、評価するRNAクローンとして 150 mM NaCl 条件下で選択された 29 クローン中 14 個の同一配列を有する DL02 の保存配列 5'-CCUAUACUG---ACGU-3'を有する DL03, DL28 と保存配列 5'-ACGU-3'を有する DL14 の RNA クローンを選択した。また、300 mM NaCl 条件下で選択された 27 クローン中 6 個の同一配列を有する DH05 の保存配列 5'-CACA---UGAA-3'を有する DH15, DH17 及び 27 クローン中 2 個の同一配列を有する DH22 の RNA クローンを選択した。これらの RNA クローンと 5FAM-Rev、7mC-Rev、Pyr-Rev、NBD-Rev の四種類の蛍光修飾 Rev ペプチドを用いて、ドーパミンに対する蛍光性リボヌクレオペプチドセンサーの網羅的な選別を行った(図5-9)。

5FAM-Rev、7mC-Rev、Pyr-Rev、NBD-Rev の各種蛍光修飾 Rev を用いた場合、各種の蛍光分子に由来する蛍光強度変化が認められた。7mC-Rev の場合、DL02, DL03, DL28, DH05 がドーパミン濃度依存的な蛍光強度変化の上昇を示した。NBD-Rev の場合、DL02, DL28, DH05, DH15 がドーパミン濃度依存的な蛍光強度変化の上昇を示した。Pyr-Rev の場合、DL02, DL03, DH22 がドーパミン濃度依存的な蛍光強度変化の上昇を示し、DH22 がドーパミン濃度依存的な蛍光強度変化の減少を示した。5FAM-Rev の場合、DH17 がドーパミン濃度依存的な蛍光強度変化の上昇を示し、DL14, DH22 がドーパミン濃度依存的な蛍光強度変化の減少を示した。これらの結果から、蛍光性リボヌクレオペプチドセンサーの迅速な選別によって、蛍光性ドーパミンセンサーが探索可能であることを示した。

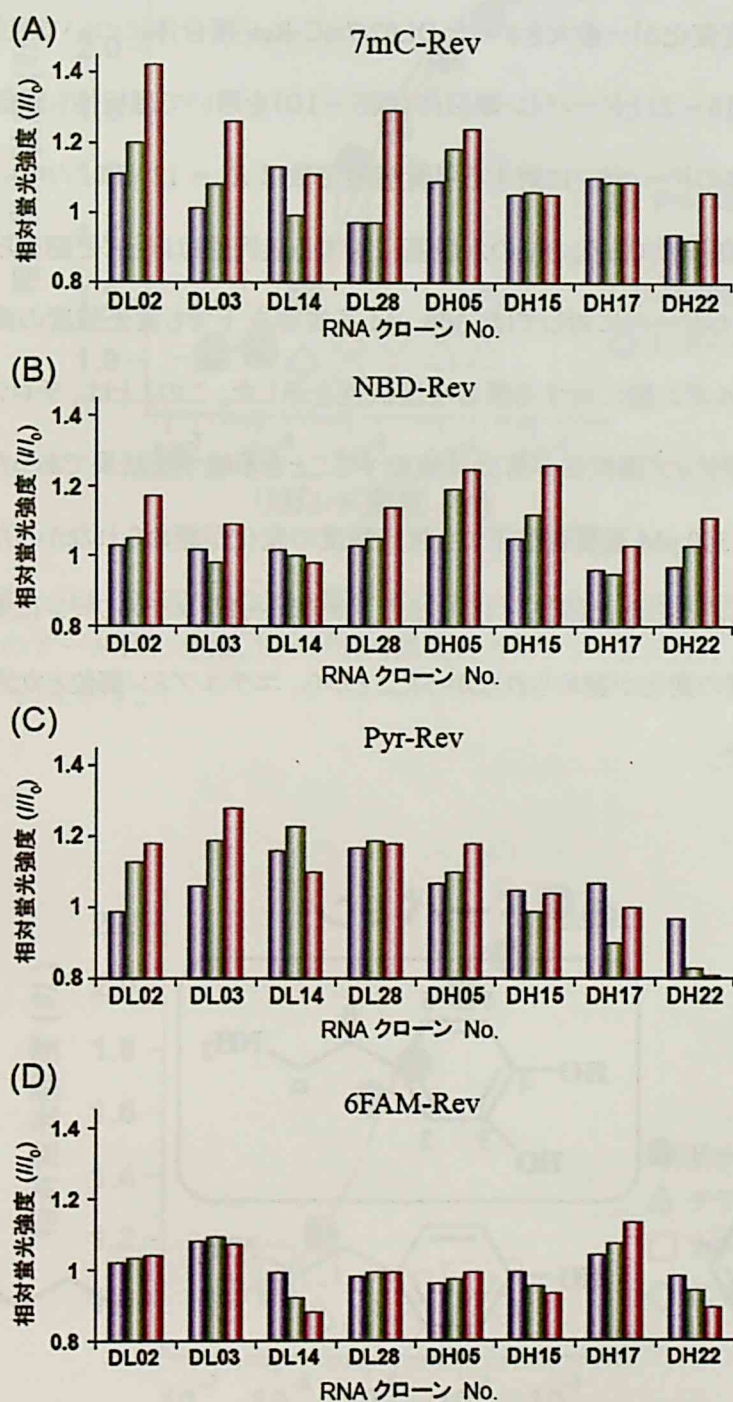


図5-9 各 0.01, 0.1, 1 mM ドーパミン存在下での(A)7mC-Rev、(B)NBD-Rev、(C)Pyr-Rev、(D)6FAM-Rev と各 RNA クローン複合体の相対蛍光強度の比較

5-2-3 ドーパミン結合性リボヌクレオペプチドセンサーの機能評価

ドーパミン結合性リボヌクレオペプチドセンサーの選別結果から、150 mM NaCl の条件下で選択されたクローンのうち蛍光強度変化が一番大きかった DL02/7mC-Rev 複合体について機能評価を行った。ドーパミンの代謝産物(図5-2)とドーパミン類似体(図5-10)を用いて選択性も評価した。

DL02/7mC-Rev 複合体のドーパミンに対する平衡解離定数は $K_d = 12 \mu\text{M}$ 、ノルエピネフリンに対する平衡解離定数は $K_d = 18 \mu\text{M}$ であり、 β 位の水酸基に対する選択性はほとんど認められなかった(図5-11)。一方、チロシンとL-ドーパに対しては、300 μM 基質存在下でも蛍光強度の変化が認められなかったことから、 α 位のカルボン酸に対する顕著な選択性を示した。このことは、チロシンアガロース樹脂(図5-5)に対するネガティブ選択法が有効に機能することを示唆する結果であった。

さらにチラミンに対して 300 μM 基質存在下でも蛍光強度の変化が認められなかったことから、3 位の水酸基に対する選択性も認められた(図5-12)。また、カテコールとエチルアミンに対しても 300 μM 基質存在下でも蛍光強度の変化が認められなかったことから、エチルアミン部位とカテコール部位に対しても選択性が認められた。

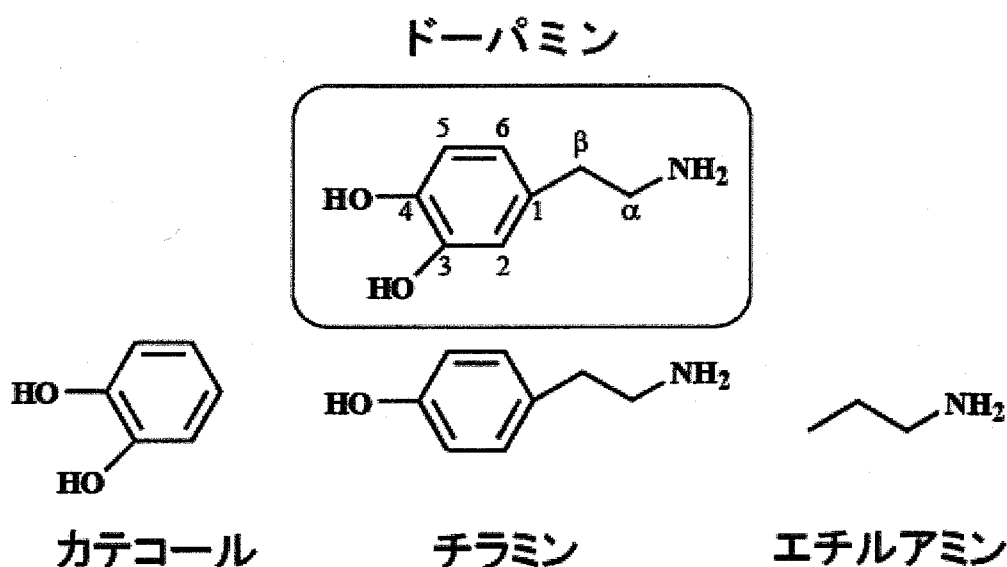


図5-10 ドーパミンとドーパミン構造類似体の化学構造

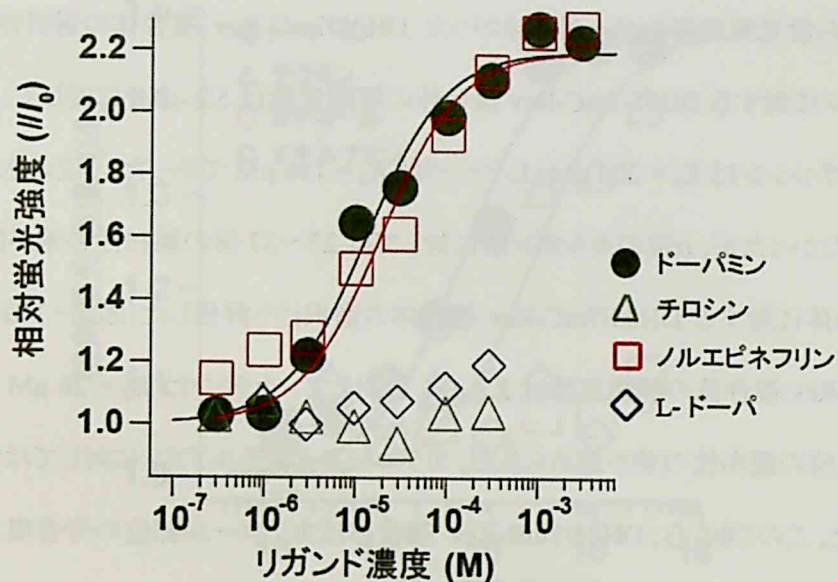


図5-11 DL02/7mC-Rev 複合体のカテコールアミンに対する滴定曲線

[各リガンド濃度のデータポイントは、ドーパミン(黒丸)、チロシン(緑三角)、ノルエピネフリン(赤四角)、L-ドーパ(青ダイヤ)で示す。]

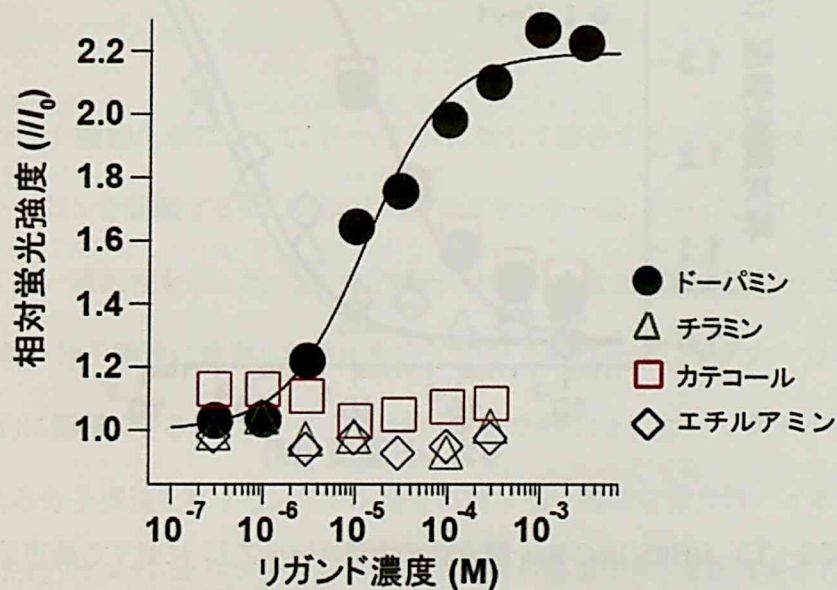


図5-12 DL02/7mC-Rev 複体のドーパミン構造類似体に対する滴定曲線

[各リガンド濃度のデータポイントは、ドーパミン(黒丸)、チラミン(緑三角)、カテコール(赤四角)、エチルアミン(青ダイヤ)で示す。]

次に、300 mM NaCl の条件下で選択されたクローンのドーパミン結合性リボヌクレオペプチドセンサーの選別結果から蛍光強度変化が一番大きかった DH05/7mC-Rev 複合体の選択性を評価した(図5-13)。ドーパミンに対する DH05/7mC-Rev 複合体の解離定数は $5.2 \mu\text{M}$ に対して、ノルエピネフリンは $K_d = 5.4 \mu\text{M}$ 、チロシンは $K_d = 204 \mu\text{M}$ 、L-ドーパは $K_d = 146 \mu\text{M}$ であった。 β 位の水酸基に対する選択性は認められなかったが、 α 位のカルボン酸に対しては 27~37 倍の親和性の差が認められた。

ドーパミン類縁体に対する DH05/7mC-Rev 複合体の選択性も評価した(図5-14)。ドーパミンに対する DH05/7mC-Rev 複合体の解離定数は $5.2 \mu\text{M}$ に対して、チラミンは $K_d = 26 \mu\text{M}$ であり、3 位の水酸基に対して 5 倍の親和性の差が認められた。カテコールとエチルアミンに対しては蛍光強度変化が観測できなかった。このことから、DH05/7mC-Rev 複合体はカテコール部位の芳香環とエチルアミン部位を識別するセンサーであることが明らかになった。

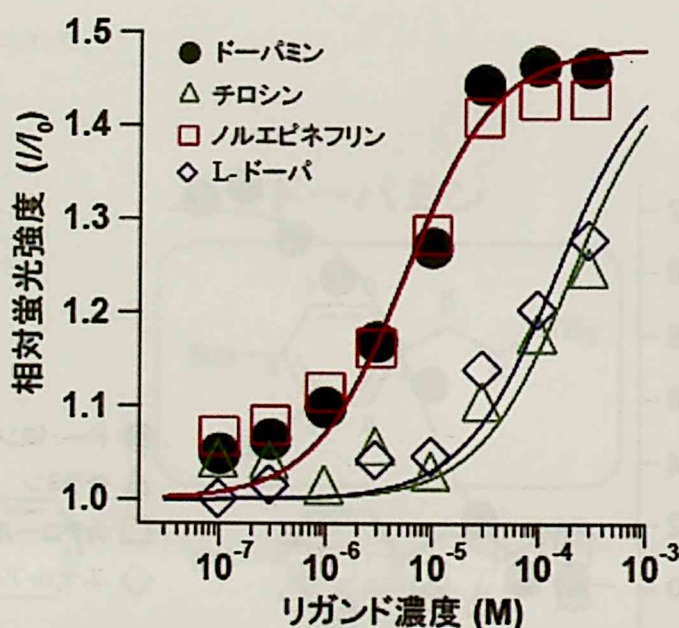


図5-13 DH05/7mC-Rev 複合体のカテコールアミンに対する滴定曲線
[各リガンド濃度のデータポイントは、ドーパミン(黒丸)、チロシン(緑三角)、ノルエピネフリン(赤四角)、L-ドーパ(青ダイヤ)で示す。]

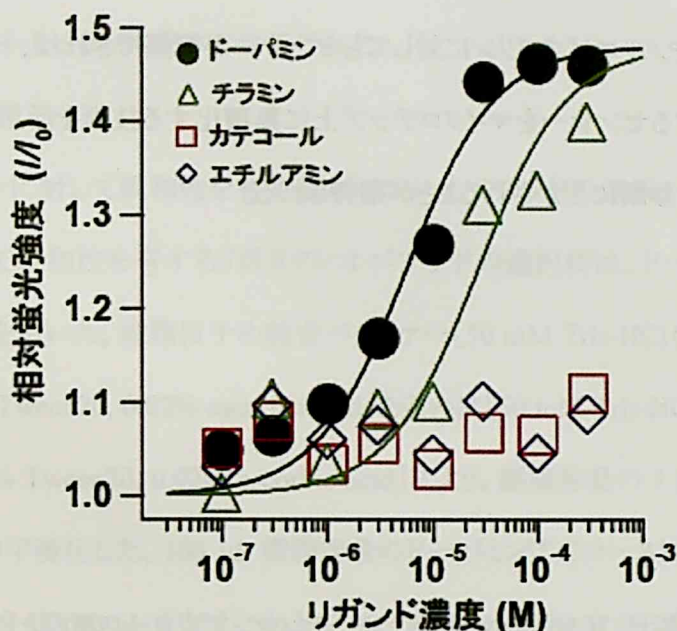


図5-14 DH05/7mC-Rev 複合体のドーパミン構造類似体に対する滴定曲線

[各リガンド濃度のデータポイントは、ドーパミン(黒丸)、チラミン(緑三角)、カテコール(赤四角)、エチルアミン(青ダイヤ)で示す。]

5-3 結論

リボヌクレオペプチド機能化法によって、ドーパミンに対して結合するリボヌクレオペプチドセンサーが作製できた。ドーパミンを認識するリボヌクレオペプチドセンサーは、ドーパミンの分子構造に由来する官能基に対して高い選択性を示した。これまで報告されている蛍光法によるドーパミンの検出では、カテコールアミン類の分子構造に依存した検出を行うことができなかった。シグナル分子の特徴的な部分構造を高選択的に認識できるセンサーの作製法が構築できたことにより、シグナル伝達経路における複雑多岐にわたる分子構造を有するシグナル分子に対する一般的な蛍光性バイオセンサーの構築方法論として、蛍光性リボヌクレオペプチドセンサーの作製法が適用できる可能性を示した。

第五章で構築した蛍光性リボヌクレオペプチドセンサーは、ノルエピネフリンのβ位の水酸基に対して識別できなかった。しかし、チロシンアガロースを用いたネガティブ選択法が機能していたことから、ノルエピネフリンを用いたネガティブ選択法を適用することによって、ノルエピネフリンのβ位の水酸基も識

別できるリボヌクレオペプチドセンサーの構築が可能であると考えられる。さらに、ドーパミン以外の代謝産物である L-ドーパやノルエピネフリンに対してもセンサーが構築できれば、ドーパミン関連の疾患に関与する物質を認識するセンサーをマイクロチップ上に集積化する技術を活用して、ドーパミン関連疾患の早期発見あるいは診断に生かされることが期待される。

5-4 実験の部

5-4-1 試薬

ドーパミンアガロース樹脂は ICN 社から購入した。チロシンアガロース樹脂とドーパミン、ノルエピネフリンは Sigma 社から購入した。アスコルビン酸、L-チロシン、L-ドーパ は和光純薬社から購入した。カデコール、エチルアミン、チラミンは東京化成社から購入した。Klenow DNA ポリメラーゼ、制限酵素 (*Bam*HI、*Eco*RI) は New England Biolab 社から購入した。Pyrobest DNA ポリメラーゼ、TaKaRa Ligation Kit Ver.2 は TaKaRa 社から購入した。ライブラリー作製用 DH5 α コンピテントセルは Invitrogen 社から購入した。逆転写酵素[AMV (Avian Myeloblastosis Virus) Reverse Transcriptase]は Promega 社から購入した。RNA 転写キット (Ampli Scribe T7 High Yield Transcription Kit) は Epicentre 社から購入した。Bacto Trypton、Yeast Extract、Bacto Agar はナカライテスク社より購入した。DNA ライブラリー用の DNA の合成は Amersham Pharmacia 社に依頼した。PCR プライマー用の DNA の合成は Gene Design 社に依頼した。QIAprep Spin Mini Prep Kit は Qiagen 社から購入した。その他の試薬は分子生物学用もしくは特級のものを使用した。

PCR は BIO-RAD 社 iCycler Thermal Cycler あるいは TaKaRa 社 PCR Thermal Cycler PERSONAL を使い、標準的な PCR 反応は、TaKaRa 社の Pyrobest DNA ポリメラーゼを用いて、添付の Pyrobest Buffer II 反応液中 0.5 μ M のプライマー-DNA を使い 0.2 mM の dNTP の条件で行った。

5-4-2 ランダム領域の塩基長が異なる DNA ライブラリーの作製

第三章の実験の部3-4-2と同様の方法で行った。

5-4-3 ランダム領域の塩基長が異なる RNA ライブラリーの作製

第三章の実験の部3-4-3と同様の方法で行った。

5-4-4 ドーパミンに対して親和性を有するリボヌクレオペプチドの選択

ドーパミンに対して親和性を有するリボヌクレオペプチドの選択には、ドーパミンアガロース樹脂 (6 nmol/ml 樹脂容量) を用いた。樹脂は予め結合バッファー [50 mM Tris-HCl (pH7.6), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.005% Tween20, 0.02% ascorbic acid] あるいは [50 mM Tris-HCl (pH7.6), 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.005% Tween20, 0.02% ascorbic acid] により、樹脂容量の 3 倍量の結合バッファーで 3 回洗浄することにより平衡化した。100 μ L 樹脂容量のドーパミンアガロース樹脂に、1 μ M の RNA、1.5 μ M Rev ペプチド混合液 100 μ L を加え、氷上で 30 分間時々攪拌しながら遮光下で結合させた。10 ラウンド目からは、チロシンアガロース樹脂 (20 μ mol/mL) 10 μ L 樹脂容量に対して、遮光下で氷上 30 分間結合させてから、ドーパミンアガロース樹脂に加えた。結合反応後、上澄を除いた後、樹脂は 200 μ L の結合バッファーで、5000 g、4 $^{\circ}$ C で 1 分間遠心し、上澄を除去する操作を 3 回繰り返して洗浄した。樹脂に結合した RNA は、氷上で遮光下において 5 mM ドーパミンを含んだ結合バッファー 400 μ L で 15 分間溶出させた。酢酸ナトリウム存在下エタノール沈殿を行い RNA を回収した。

RNA を 10 μ L TE [10 mM Tris-HCl (pH 7.6)、1 mM EDTA] に溶解し、3 μ L の RNA を鋳型として、12 μ M の REV 04 プライマー (5'-GGAATAGGCCTGTACCGTC-3') 存在下、80 $^{\circ}$ C 3 分間加熱後、30 分間かけて 25 $^{\circ}$ C まで徐冷しアニーリングさせた後、逆転写反応 (42 $^{\circ}$ C、30 分間) を行った。反応液 20 μ L を 99 $^{\circ}$ C、5 分間加熱処理し逆転写酵素を失活させた後、反応液の 1/10 量について REV 04、FOR 01 プライマー (5'-TCTAATACGACTCACTATAGGAATAGGTCTGGGCGCA-3') を用いて、変性 98 $^{\circ}$ C、10 秒、アニーリング 55 $^{\circ}$ C、30 秒、伸長反応 72 $^{\circ}$ C、30 秒の条件で PCR を行った。4 サイクル毎に 20 サイクルまで反応液を分取し、8 % 非変性ポリアクリルアミド (アクリルアミド:ビスアクリルアミド = 29:1) 電気泳動により増幅 DNA を分析した。ポリアクリルアミド電気泳動での分析により、指数的に DNA の増幅が確認される最小のサイクル数で PCR を行い、新たな DNA ライブラリーを調製した。PCR 産物は、酢酸アンモニウム溶存在下 2-プロパノール沈殿により精製し、次のセレクションに供した。

5-4-5 選択されたリボヌクレオペプチドの RNA 配列解析

第二章の実験の部2-4-6と同様の方法で行った。

5-4-6 クローニングを行ったプラスミド DNA の配列解析

第二章の実験の部2-4-7と同様の方法で行った。

5-4-7 配列解析を行ったプラスミド DNA から RNA の調製

第三章の実験の部3-4-10と同様の方法で行った。

5-4-8 リボヌクレオペプチドセンサーの 96 穴プレートを用いた蛍光測定

蛍光測定は、Perkin Elmer 社 Wallac ARVOsx 1420 multilabel counter を用いて行った。測定に使用した RNA は、塩濃度 10 mM Tris (pH 7.6), 150 mM NaCl 存在下で 80°C, 3 分温置後、4°C に急冷させてから使用した。測定溶液 100 μ L 中には各基質濃度存在下になるようにし、1 μ M RNA, 1 μ M 蛍光修飾 Rev 存在下で終塩濃度は、[50 mM Tris-HCl (pH7.6), 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.005% Tween20, 0.02% ascorbic acid]あるいは[50 mM Tris-HCl (pH7.6), 300 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.005% Tween20, 0.02% ascorbic acid]にて測定した。プレートに試料溶液を加えた後、Wallac ARVOsx 1420 multilabel counter で 1 分間の攪拌後、4°C で 30 分間静置してから各蛍光分子に適した波長で蛍光強度を測定した。7mC-Rev と Pyr-Rev 誘導体は 350 nm の波長で励起し、390 nm の発光波長を測定した。6FAM-Rev 誘導体は 485 nm の波長で励起し、535 nm の発光波長を測定した。NBD-Rev 誘導体は 475 nm の波長で励起し、535 nm の発光波長を測定した。リボヌクレオペプチドセンサーの基質分子との解離定数 K_d は、以下の理論式に従って算出した。解析ソフトには Igor Pro を用いた。

$$F = 1 + A \{ ([\text{蛍光性 RNA-ペプチド複合体}] + [\text{基質分子}] + K_d) - \{ ([\text{蛍光性 RNA-ペプチド複合体}] + [\text{基質分子}] + K_d)^2 - 4 \times [\text{蛍光性 RNA-ペプチド複合体}] [\text{基質分子}] \}^{1/2} / 2 \times [\text{蛍光性 RNA-ペプチド複合体}] \}$$

蛍光性 RNA-ペプチド複合体と基質分子存在下での蛍光強度 (I)、蛍光性 RNA-ペプチド複合体と

基質分子非存在下での蛍光強度 (I_0) とした相対的蛍光強度 (I/I_0) を F、A は結合飽和における 1-相対的蛍光強度 (I/I_0) の値、 $[\]$ は各濃度を示す。

引用文献

- [1] Nestler, E. J. *Cell* **1994**, 79, 923.
- [2] Venton, B. J.; Wightman, R. M. *Anal. Chem. A-Pages* **2003**, 75, 414A.
- [3] Jay, T. M. *Prog. Neurobiol.* **2003**, 69, 375.
- [4] 日本生化学編、生化学実験講座 11 アミノ酸代謝と生体アミン(下)、東京化学同人、1977
- [5] Zerbino, J. O.; Sustersic, M. G. *Langmuir* **2000**, 16, 7477.
- [6] Yoshitake, T.; Kehr, J.; Todoroki, K.; Nohta, H.; Yamaguchi, M. *Biomed. Chromatogr.* **2006**, 20, 267.
- [7] Tsunoda, M.; Imai, K. *Bunseki Kagaku* **2003**, 52, 1081.
- [8] Weil-Malherbe, H. *Pharmacol. Rev.* **1959**, 11, 278.
- [9] Euler, U. S.; Floding, I. *Acta. Pysiol. Scand.* **1955**, 118, 45.
- [10] Secor, K. E.; Glass, T. E. *Org. Lett.* **2004**, 6, 3727.
- [11] Mannironi, C.; Di Nardo, A.; Fruscoloni, P.; Tocchini-Valentini, G. P. *Biochemistry* **1997**, 36, 9726.

第六章

総括

これまで生体高分子リセプターを基盤としたバイオセンサーの技術開発は進展してきたが、克服すべき課題は山積みである。精緻な分子認識能を有する受容体タンパク質、酵素あるいは RNA アプタマーなどのリセプター分子を蛍光分子で化学修飾することによって、蛍光性バイオセンサーが構築されてきたが、多くの場合、もとのリセプター活性を低下させる問題点がある。また、細胞内シグナル伝達経路において、任意のシグナル分子に対して迅速かつ高感度に検出できる蛍光性バイオセンサーの一般的な構築方法論も、現在までに確立されていない。

本論文では、三次元構造情報に基づいた RNA-ペプチド複合体(リボヌクレオペプチド)の合理的な分子設計と *in vitro* セレクション法による機能化法を組み合わせ、標的とする分子に対して高い親和性と優れた選択性を有するリボヌクレオペプチドリセプターの構築方法論の概念と、蛍光分子を基質結合領域へ化学修飾することなく、幅広い濃度域で応答するリボヌクレオペプチドセンサーの構築方法論の概念を基礎として、細胞内シグナル伝達経路に関わるシグナル分子に対する蛍光性バイオセンサーの構築を目指した。

第二章では、リボヌクレオペプチドリセプター構築方法論に基づいて、細胞内シグナル伝達経路におけるシグナル分子であるリン酸化チロシンに対するリボヌクレオペプチドリセプターを作製した。リン酸化チロシンに結合するリボヌクレオペプチドリセプターは、チロシン部位の芳香環とリン酸基に対して高い選択性を有していた。これにより、リボヌクレオペプチドリセプターの作製法は、ATP 以外の分子に対しても適用可能な方法論であることを示した。

第三章では、第二章でリン酸化チロシンを特異的に認識するリボヌクレオペプチドリセプターが作製できたことから、細胞内シグナル伝達経路に関わるリン酸化タンパク質中に含まれるリン酸化チロシン残基とその周辺のアミノ酸配列までも識別するリボヌクレオペプチドリセプターとリボヌクレオペプチドセンサーの作製を行った。リン酸化チロシンを含むペプチドに対して高選択的に検出できる蛍光性バイオセンサーが作製できたことにより、シグナル伝達経路に関わる特定のリン酸化タンパク質を高選択的

に検出できる蛍光性バイオセンサーの作製が可能であることを明らかにした。また、リボヌクレオペプチドセンサーの作製法は、ATP 以外の分子に対しても適用可能な方法論であることも示した。

第四章では、リボヌクレオペプチドのペプチドサブユニットにおける N 末端部位への蛍光分子導入法を改良することで、リボヌクレオペプチドセンサー作製法の最適化を図った。蛍光分子とペプチドサブユニットの間をつなぐリンカー分子の挿入、あるいは蛍光分子とペプチドサブユニットの結合様式を変えることによって、リボヌクレオペプチドセンサーの機能を向上させることに成功し、リボヌクレオペプチドセンサーの作製法が、より拡張可能な一般的な方法論であることを示した。

第五章では、ATP やリン酸化チロシンとは異なった化学的特性を有するシグナル分子ドーパミンに対するリボヌクレオペプチドセンサーの作製を行った。ドーパミンに由来する官能基を厳密に識別できる蛍光性バイオセンサーが作製できたことにより、個々のシグナル伝達経路に特徴的なシグナル分子に対する一般的な方法論としてリボヌクレオペプチドセンサーが作製できる可能性を示した。

本論文で開拓したリボヌクレオペプチドを基盤とした蛍光性バイオセンサーの作製法は、環境適合性の高い生体高分子を材料としたバイオセンサー構築方法論である。このバイオセンサー構築方法論は広範囲な標的分子に対して適用が可能であるため、分子構造が複雑多岐にわたる環境汚染物質や環境ホルモンなどに対して、高感度なリボヌクレオペプチドセンサーが迅速に作製できると考えられる。これらのリボヌクレオペプチドセンサーをマイクロチップ基盤上に集積・組織化することにより、簡便に環境評価ができる計測器の開発が期待される。また、リボヌクレオペプチドセンサーを細胞内へ導入する方法論を開発することにより、エネルギー利用システムの根幹に関わるシグナル伝達経路の理解を深めるだけでなく、環境汚染物質や環境ホルモンなどの人体への影響を検討することが可能な先導的な技術になると考えられる。本論文の成果は、持続可能社会におけるエネルギー・環境問題の解決に向けた革新的な技術を創出する基盤となる。

論文目録

第二章

主論文

A Ribonucleotide Receptor Targets Phosphotyrosine

Tetsuya Hasegawa, Katsutoshi Ohkubo, Susumu Yoshikawa and Takashi Morii

2005 年 2 月発行 *e-Journal of Surface Science and Nanotechnology* 第 3 号 33 項～37 項

参考論文

Ribonucleotides Recognize the Phosphotyrosine Residue

Tetsuya Hasegawa, Susumu Yoshikawa and Takashi Morii

2005 年 9 月発行 *Nucleic Acids Research Supplement* 第 49 号 79 項～80 項

第三章

主論文

Construction of the Phosphotyrosine Recognizing Sensor using a Ribonucleotide Complex

Tetsuya Hasegawa, Susumu Yoshikawa and Takashi Morii

投稿準備中

第四章

主論文

Stepwise Functionalization of Ribonucleotides: Optimization of the Response of Fluorescent
Ribonucleotide Sensors for ATP

Tetsuya Hasegawa, Masaki Hagihara, Masatora Fukuda and Takashi Morii

Nucleosides, Nucleotides & Nucleic acids 投稿中

参考論文

Design of sensing ribonucleopeptides for small ligands

Masaki Hagihara, Tetsuya Hasegawa, Yukiko Tanabe, Shin-ichi Sato, Susumu Yoshikawa, Katsutoshi

Ohkubo and Takashi Morii

2004 年 10 月発行 *Nucleic Acids Research Supplement* 第 48 号 33 項～34 項

学会発表

2003 年 3 月 日本化学会第 83 春季年会(東京)

リン酸化チロシンを認識するリボヌクレオペプチドリセプター

A Ribonucleotide Receptor for L-Tyrosine-O-phosphate

○長谷川 哲也・萩原 正規・佐藤 慎一・牧野 圭祐・吉川 暹・大久保 捷敏・森井 孝

2004 年 10 月 第 31 回 核酸化学シンポジウム(東京)

Design of sensing ribonucleotides for small ligands

萩原 正規・○長谷川 哲也・田邊 優貴子・佐藤 慎一・吉川 暹・大久保 捷敏・森井 孝

2005 年 3 月 日本化学会第 85 春季年会(神奈川)

リン酸化チロシンを認識する機能性リボヌクレオペプチドの開発

Development of Ribonucleotide Receptors for Phosphorylated Tyrosine Derivatives

○長谷川 哲也・森井 孝・大久保 捷敏・吉川 暹

2005 年 6 月 Gordon Research Conference Bioorganic Chemistry(アメリカ)

Ribonucleotide Receptors for phosphotyrosine

森井 孝・○長谷川 哲也

2005 年 8 月 第 15 回 バイオ・高分子シンポジウム(東京)

リン酸化チロシンを認識するリボヌクレオペプチドリセプター

○長谷川 哲也・吉川 暹・森井 孝

2005 年 9 月 第 4 回 国際核酸化学シンポジウム(福岡)

Ribonucleopeptides Recognize the Phosphotyrosine Residue

○長谷川 哲也・吉川 暹・森井 孝

2005 年 11 月 SORST ジョイントシンポジウム(大阪)

リン酸化チロシンを標的とするリボヌクレオペプチドリセプター及びセンサーの開発

○長谷川 哲也・森井 孝

2005 年 12 月 環太平洋国際化学会議(ハワイ)

Sensing of phosphotyrosine residue using the ribonucleopeptide

○長谷川 哲也・吉川 暹・森井 孝

2006 年 3 月 日本化学会第 86 春季年会(千葉)

リン酸化チロシンを標的とするリボヌクレオペプチドセンサーの開発

Development of ribonucleopeptide sensors targeting the phosphorylated tyrosine residue

○長谷川 哲也・吉川 暹・森井 孝

2006 年 9 月 バイオ関連化学合同シンポジウム(京都)

リン酸化チロシン残基を認識するリボヌクレオペプチドセンサーの開発

○長谷川 哲也・森井 孝

謝辞

終わりに臨み、本研究を遂行するにあたり多大なる有益な御助言、御指導を受け賜りました京都大学エネルギー理工学研究所生物機能科学研究分野 森井 孝教授には、謹んで感謝の意を申し上げ、心より厚く御礼申し上げます。

種々の有益な御助言並びに素晴らしい研究環境の場を与えて頂いた京都大学エネルギー理工学研究所分子集合体設計研究分野 吉川 暹教授に心より感謝申し上げます。また本論文を作成するにあたり、熱心な御指導を賜りました京都大学エネルギー理工学研究所生体エネルギー研究分野 牧野 圭祐教授に心より感謝申し上げます。

実験を行うにあたり的確な御助言を頂きました萩原 正規博士(現 大阪大学産業科学研究所)、佐藤 慎一博士(現 米国ベイラー医科大学)に深く感謝致します。

研究活動の中で様々な御助言を頂きました杉本 健二博士(京都大学エネルギー理工学研究所)、佐川 尚博士(京都大学エネルギー理工学研究所)、藤井 康代博士(現 京都学園大学)、Christine S. Chow 教授(Wayne State University)には感謝致します。研究にあたり熱心な討論を頂きました平田 晃義修士、福田 将虎修士に感謝致します。様々な局面で支援していただいた生物機能科学研究分野の方々、分子集合体設計研究分野の方々にも感謝致します。